Лекція № 10

Мультисенсори та мультиферментні масиви

Мультисенсори на основі прямого ферментного аналізу.

Мультисенсори на основі ферментного інгібіторного аналізу.

Використання мікроорганізмів як природних мультиферментних систем.

26.04.2010

Біосенсором, як правило, можна визначати лише один тип речовин, тоді як будь-який зразок може містити їхню суміш.

Проблему одночасного визначення кількох речовин можна вирішити шляхом створення <u>мультисенсорної системи</u>, коли використовується кілька сенсорів, селективних до різних речовин за рахунок використання різних ферментів.

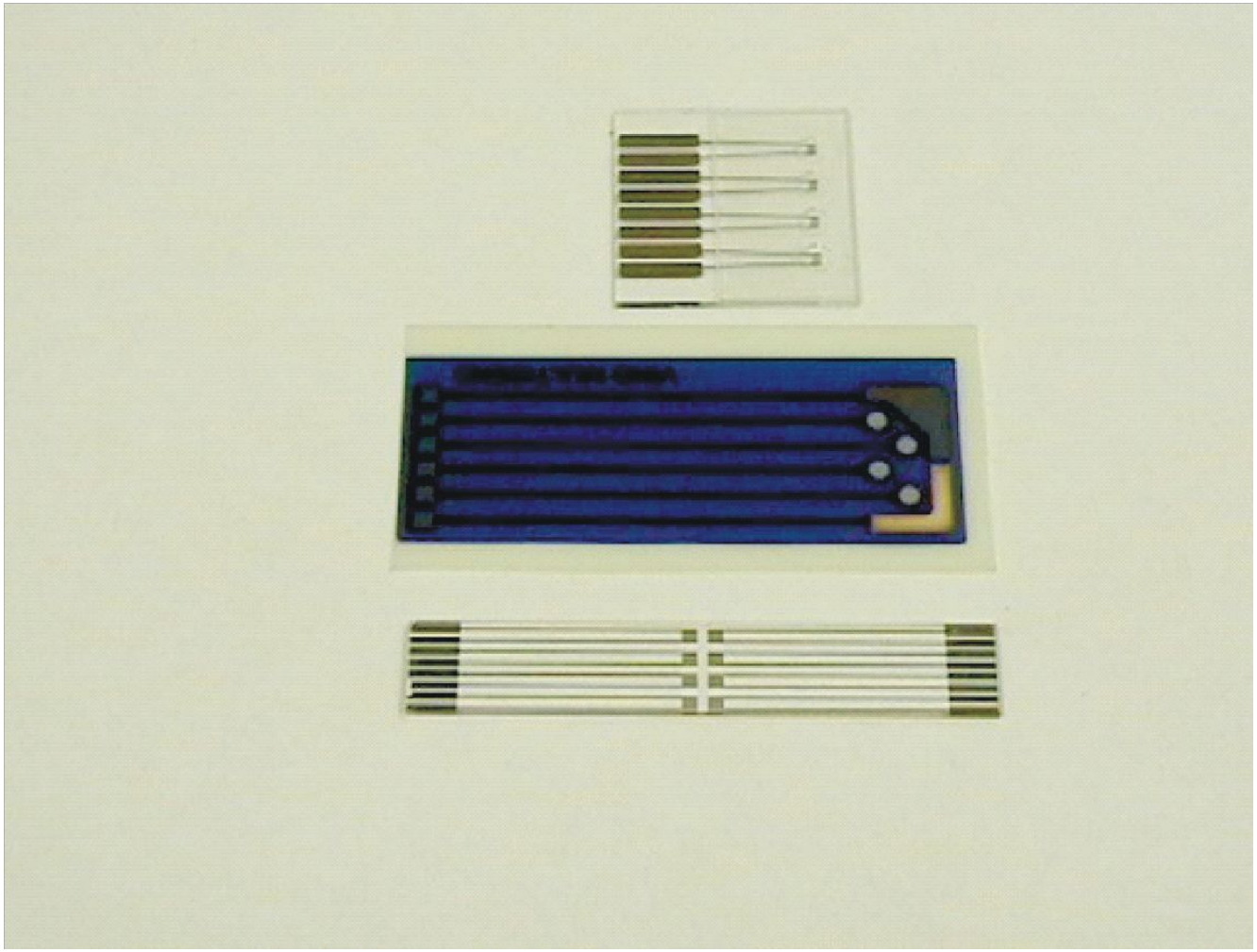
Ще більш прогресивна система – це один датчик з розміщеними на ньому кількома перетворювачами з різними біоселективними мембранами, за допомогою якого можна визначати кілька речовин одночасно.

Мультисенсори на основі прямого ферментного аналізу

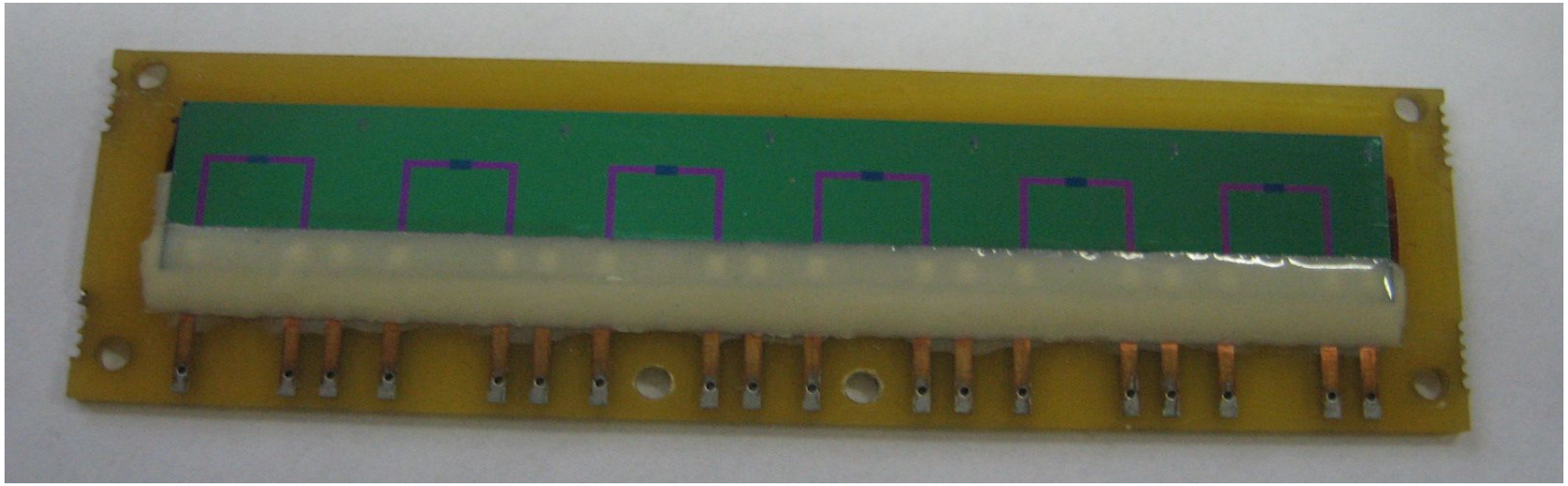
В літературі описано мультибіосенсори на основі напівпровідникових структур для одночасного визначення концентрацій глюкози і сечовини у фізіологічних рідинах.

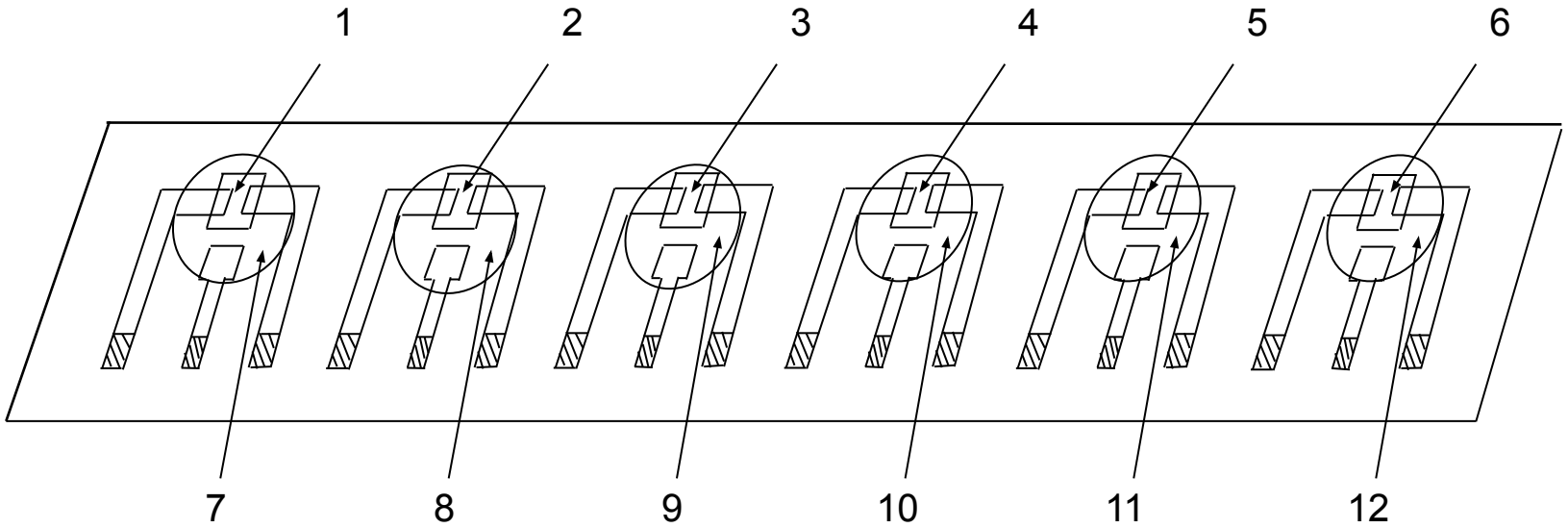
Описано аналогічний мультисенсор для визначення глюкози, сечовини та іонів калію на основі тонкоплівчастих електродів.

Також описано хімічні мультисенсори, так звані “електронні язики” і “електронні носи”, що застосовували для визначення якості вина й інших харчових продуктів.



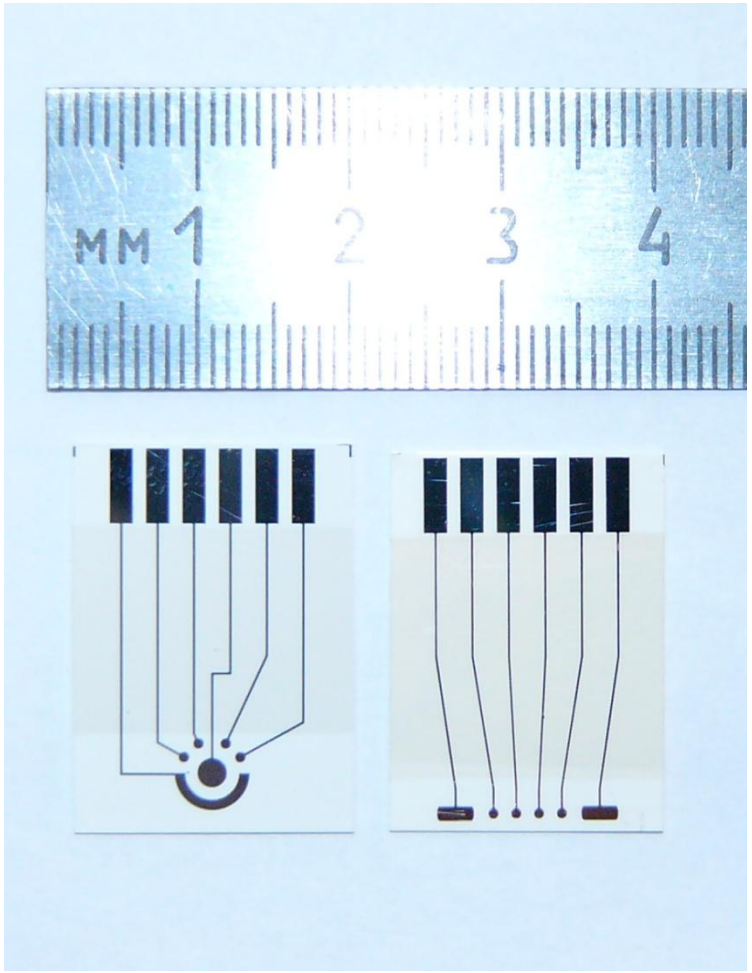
Зовнішній вигляд мультиперетворювачів виробництва Інституту хемо- і біосенсорики м. Мюнстер, Німеччина.

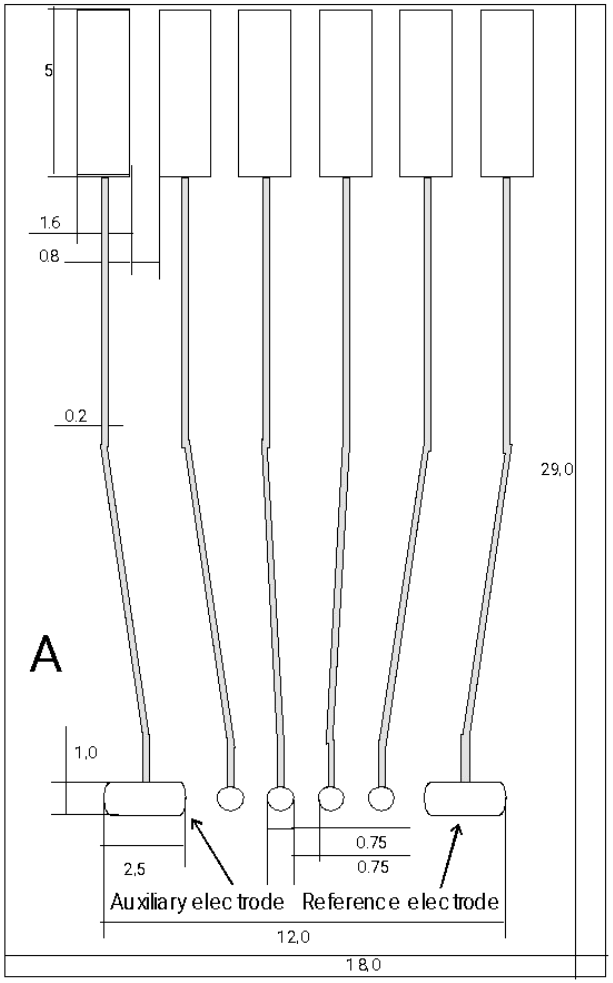


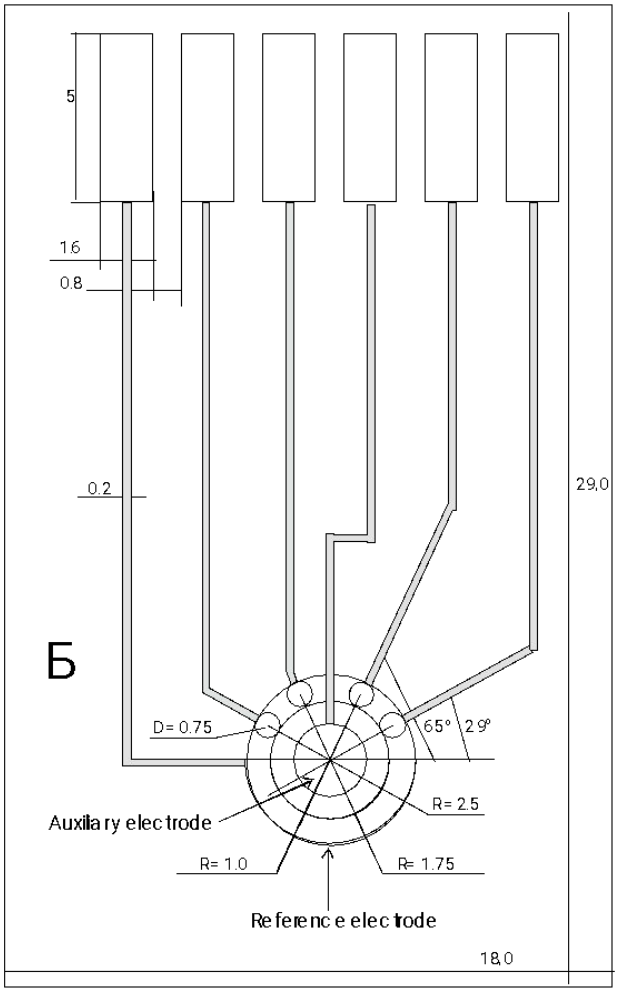


Кремнієва лінійка з 6-елементним масивом p-канальних іоноселективних польових транзисторів, виготовлених в Інституті фізики напівпровідників

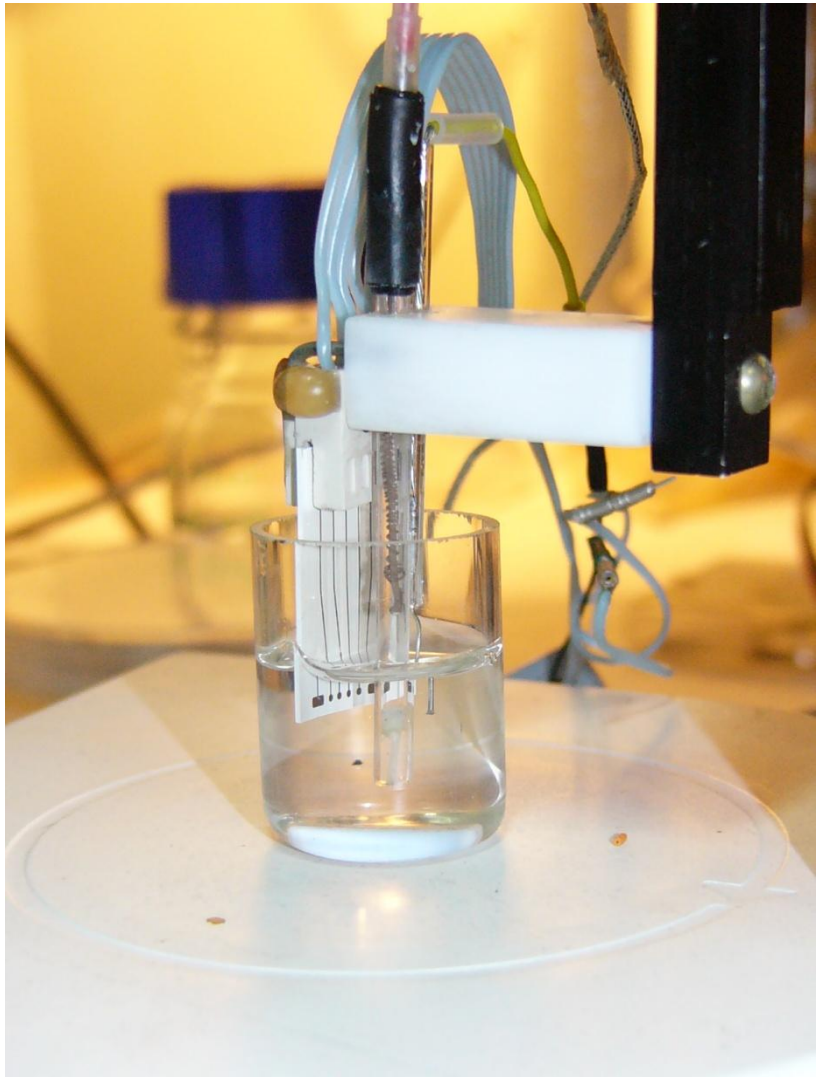
Зовнішній вигляд приладу для роботи з мультисенсором на основі лінійки pH-ПТ.



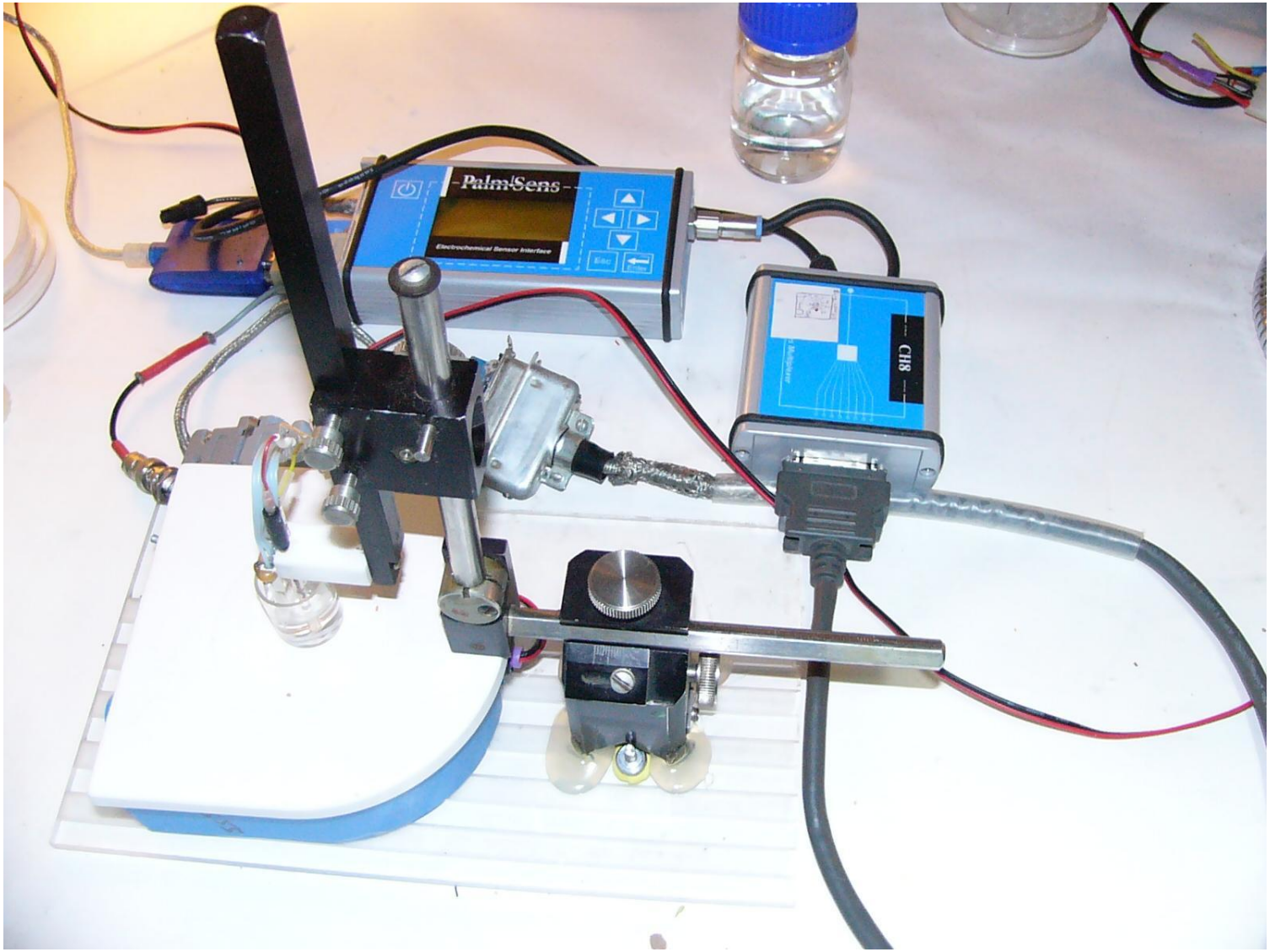




Зовнішній вигляд та схематичне зображення амперометричних мультиперетворювачів, розроблених в Інституті молекулярної біології і генетики та Інституті електродинаміки

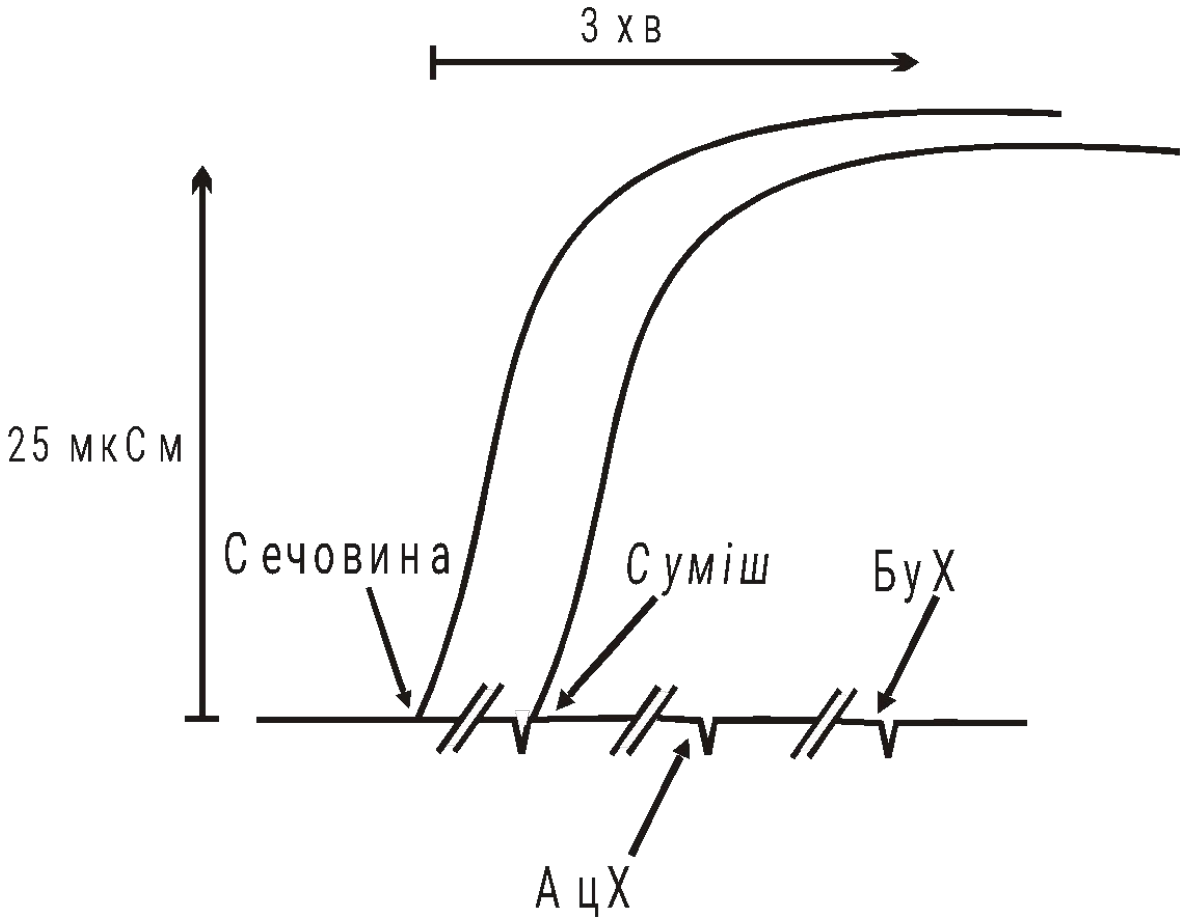


Для підключення мультисенсору до установки було розроблено та виготовлено контактний пристрій, який мав у своєму складі допоміжний платиновий електрод та електрод порівняння



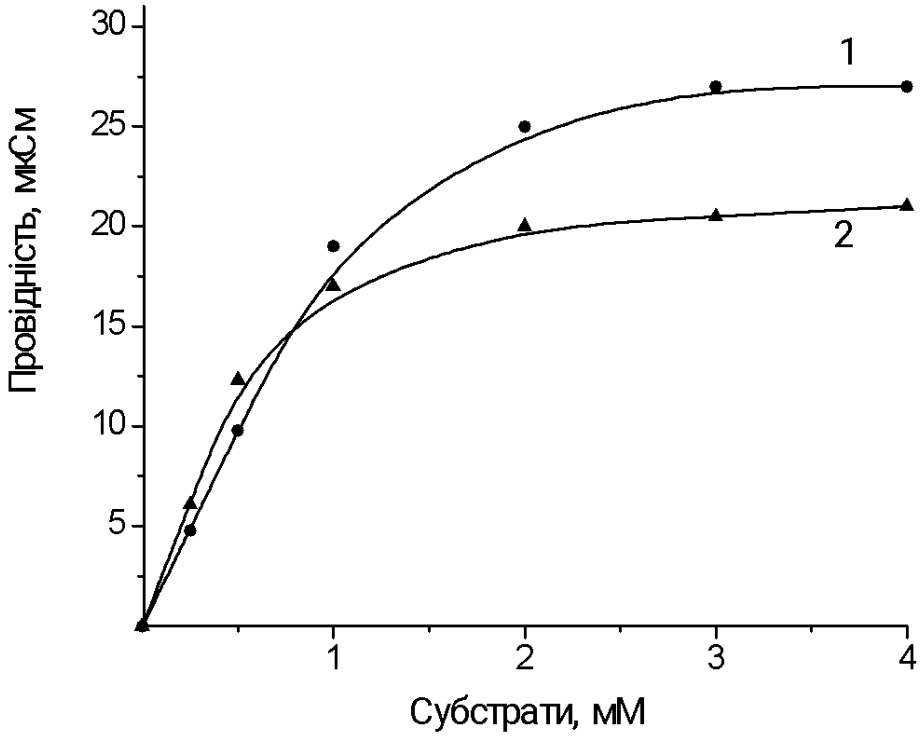
Зовнішній вигляд портативної системи для роботи з амперометричними мультибіосенсорами

Дослідження специфічності окремих сенсорів та взаємодії різних субстратів між собою

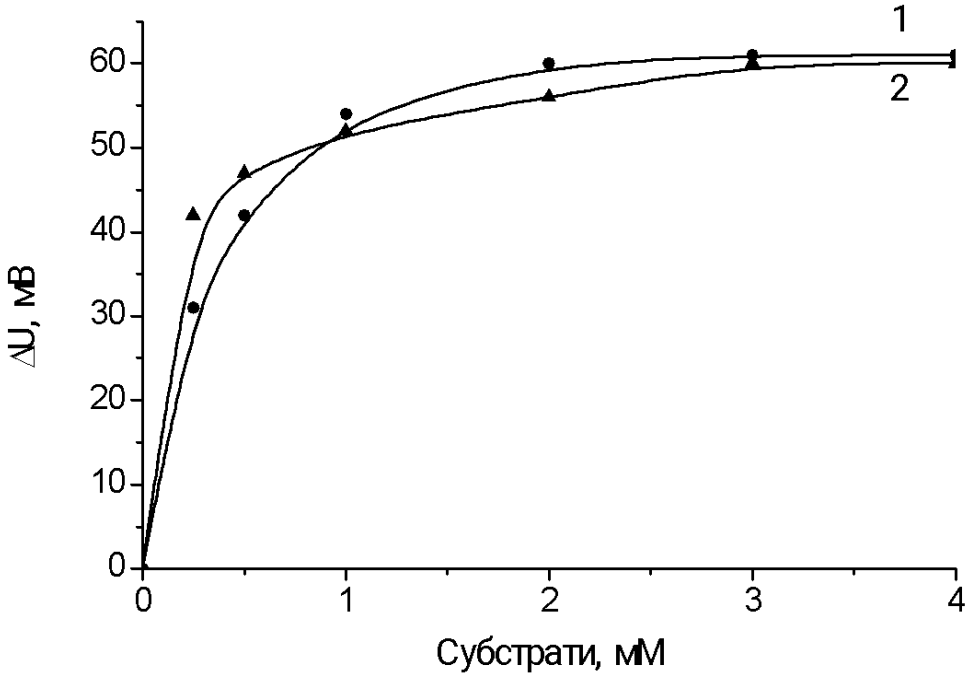


Типовий вигляд відгуків кондуктометричного уреазного біосенсора на додавання різних субстратів і їхньої еквімолярної суміші.

Залежність відгуку кондуктометричного (а) і потенціометричного (б) уреазного сенсорів від концентрації сечовини (1) і еквімолярної суміші субстратів (2).

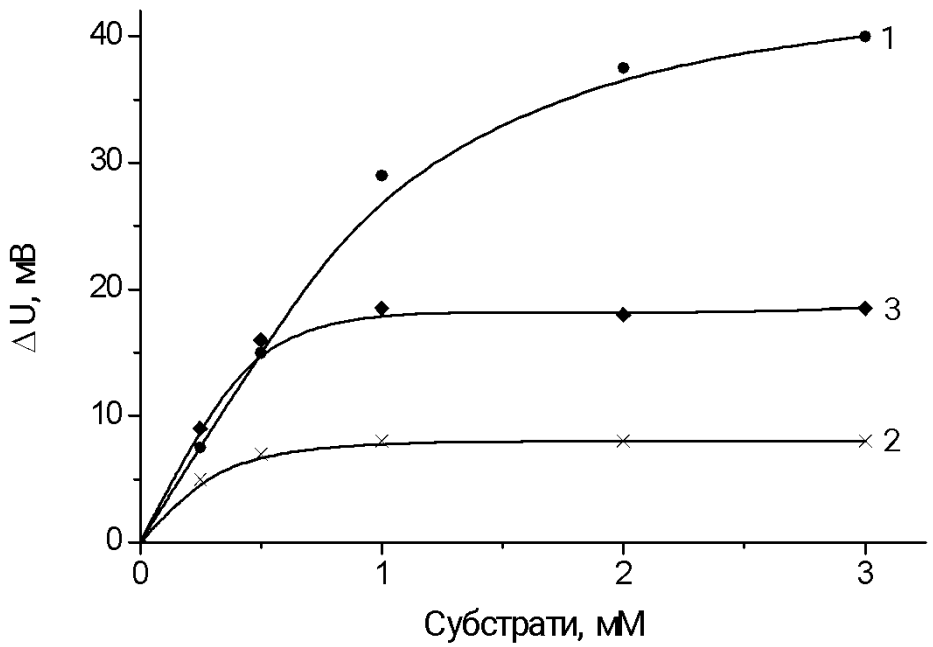


(а)

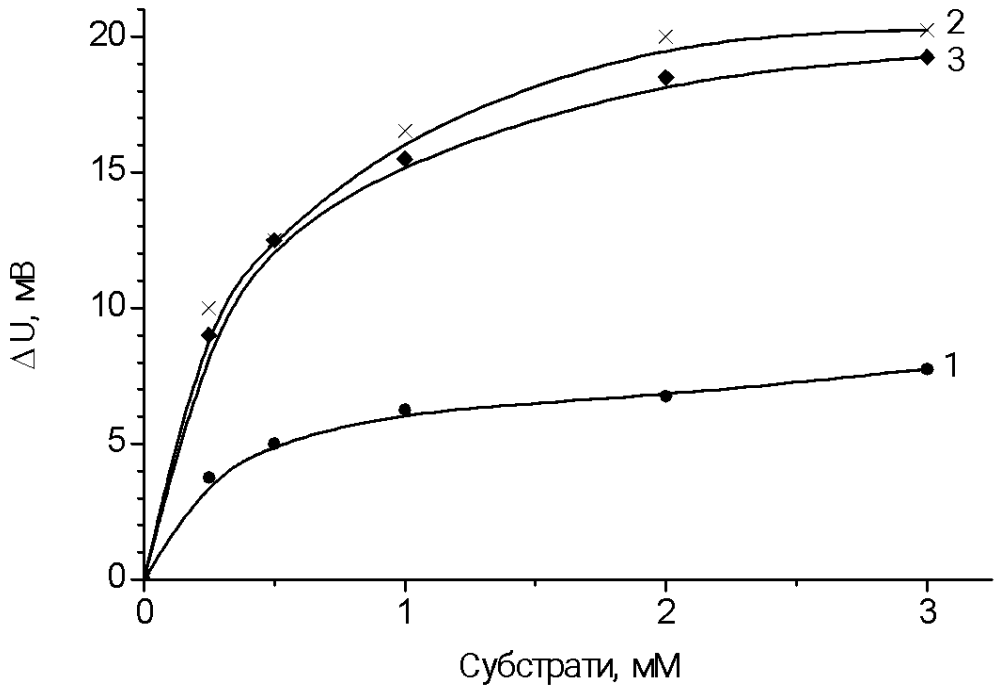


(б
)

Залежність відгуку потенціометричних біосенсорів на основі ацетилхолінестерази (а) і бутирилхолінестерази (б) від концентрації субстратів (1 – АцХ, 2 – БуХ) і їхньої еквімолярної суміші (3).



(а)



(б)

Ферментативні реакції, що лежать в основі роботи кондуктометричних мультибіосенсорів для визначення сахаридів

Інвертаза

Сахароза + H_2O □
β-D-фруктоза + α-D-глюкоза

β-Галактозидаза

Лактоза + H_2O □
галактоза + α-D-глюкоза

α-Глюкозидаза

Мальтоза + H_2O □
2 α-D-глюкоза

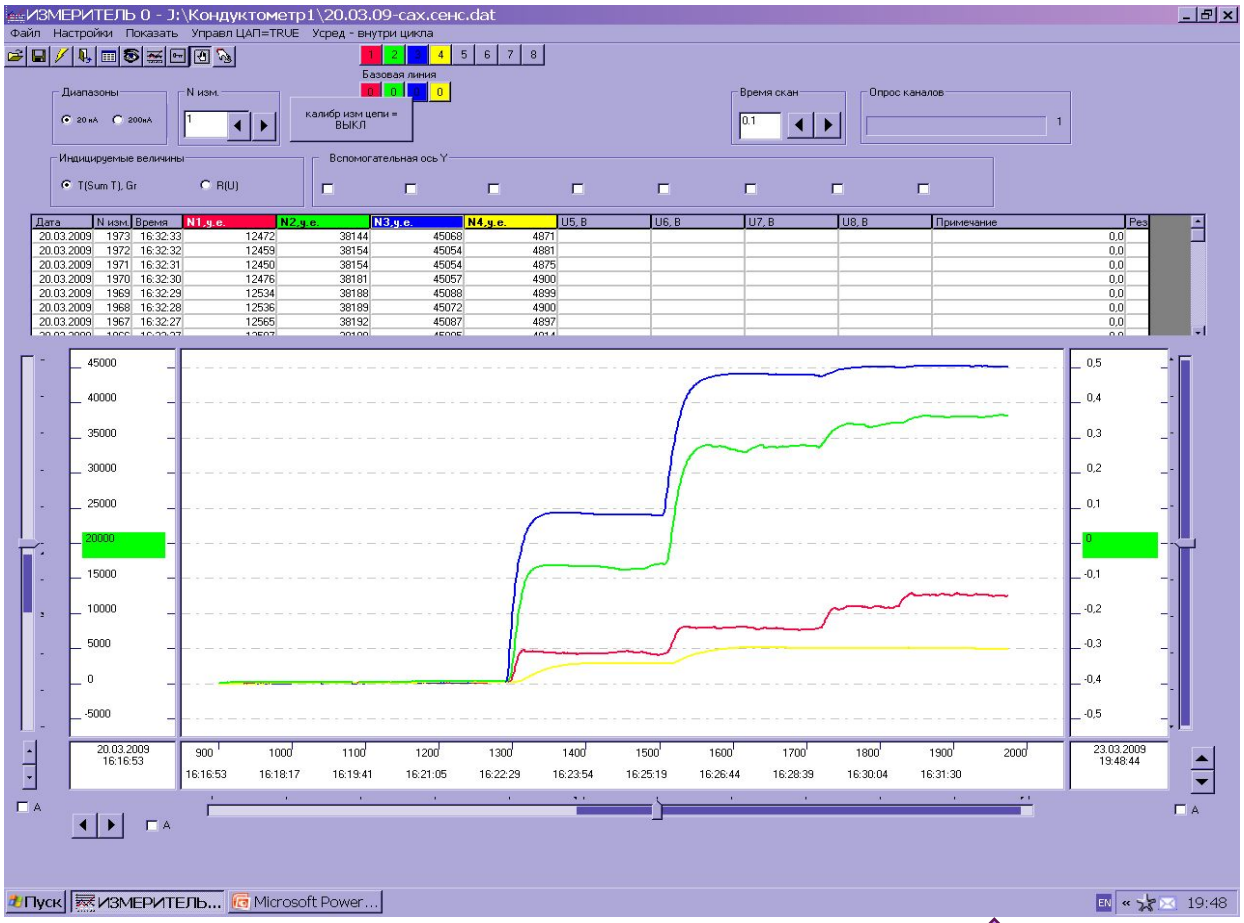
Мутаротаза

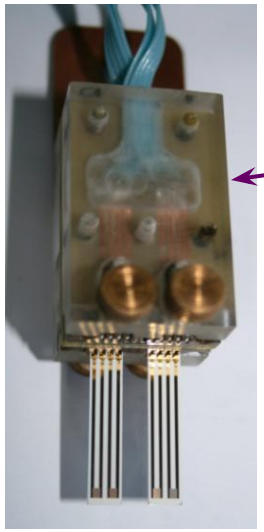
α-D-глюкоза □ β-D-глюкоза

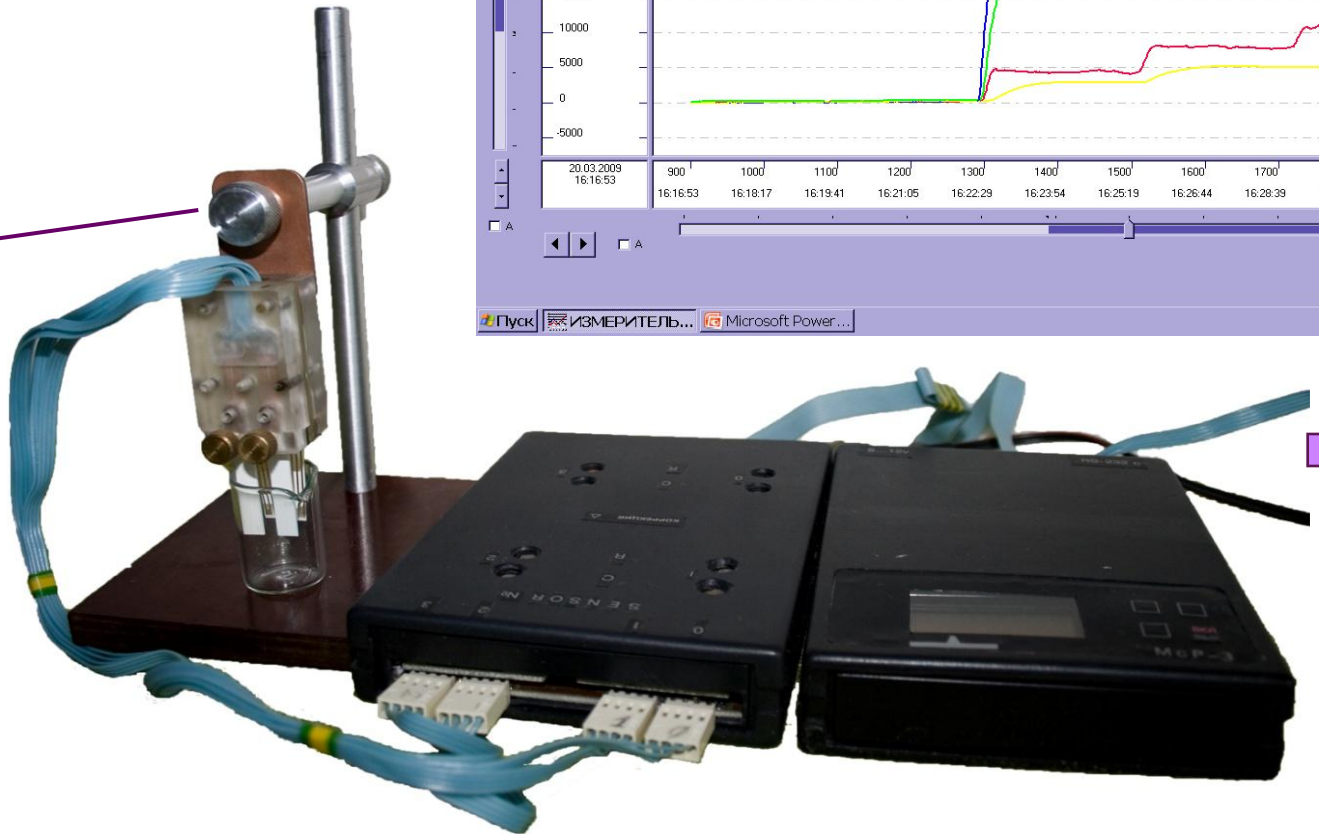
Глюкозооксидаза

β-D-глюкоза + O_2 □ D-глюконолактон + H_2O_2 ⇓
D-глюконова кислота + H_2O □ залишок кислоти + H^+

Випробування роботи біоселективних елементів для визначення сахарози, мальтози, лактози та глюкози в режимі одночасного визначення сахаридів

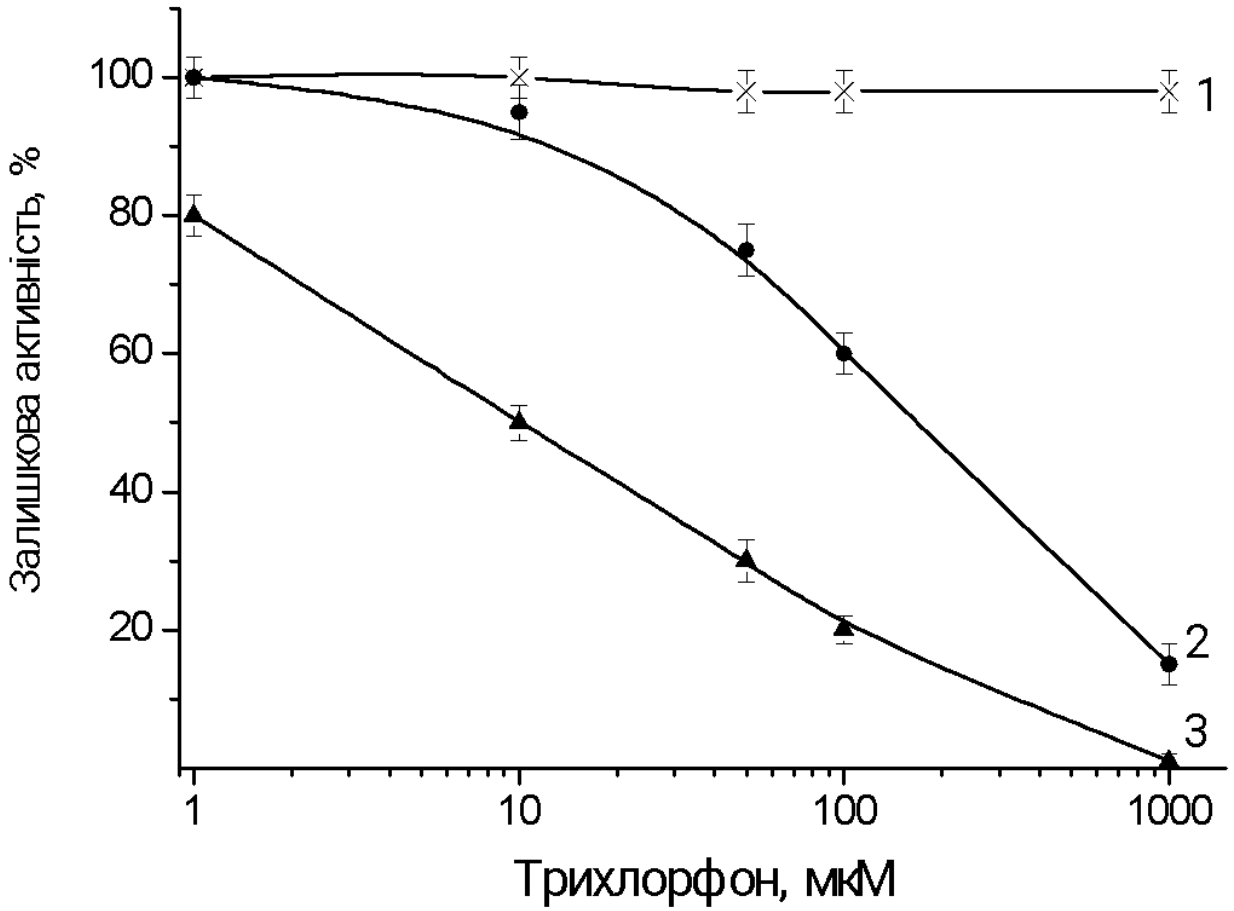




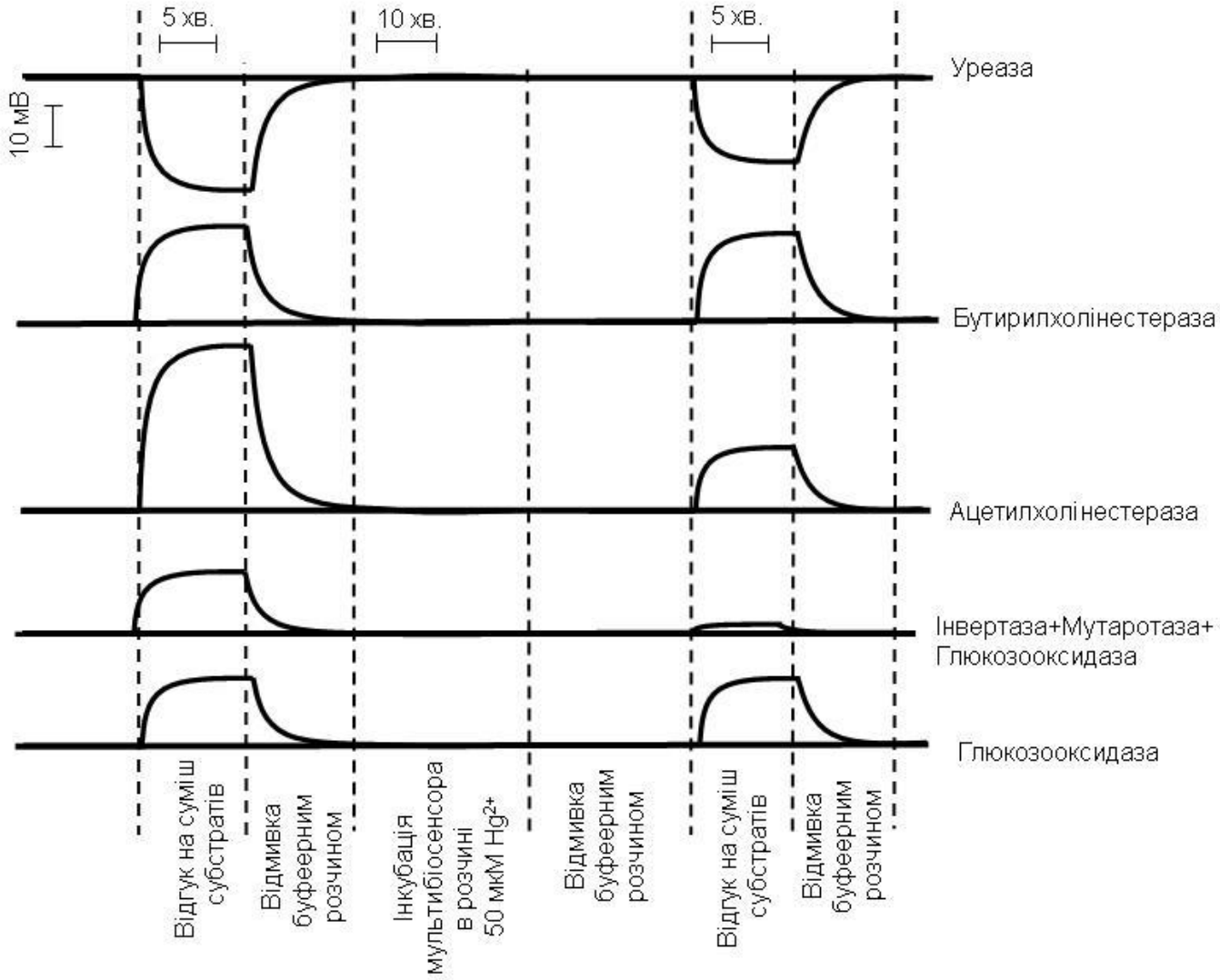


обробка сигналу комп'ютерною програмою

Мультисенсори на основі ферментного інгібіторного аналізу



Калібрувальні криві інгібування різних ферментів (1-уреаза, 2-АцХЕ, 3-БуХЕ) фосфорорганічним пестицидом трихлорфоном. Час інгібування – 20 хв. Вимірювання проводили в 5 мМ калій-фосфатному буфері, pH 7,4, еквімолярна концентрація суміші субстратів – 2 мМ.



Відгуки мультибіосенсора на основі ІСПТ на додавання суміші субстратів до та після інгібування ферментів іонами ртуті

Ступінь інгібування ферментів різними токсинами, %

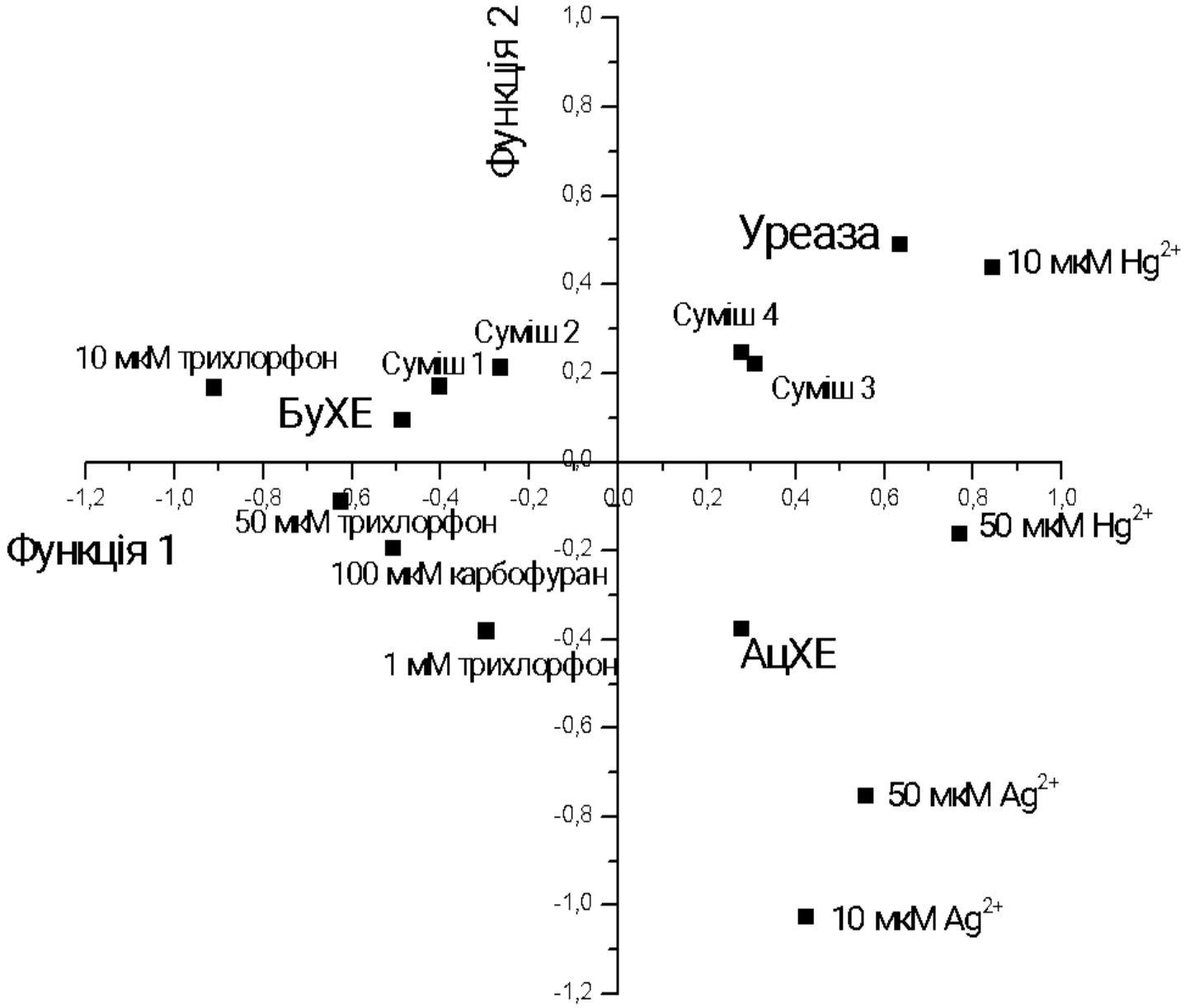
	Уреаза	БуХЕ	АцХЕ
10мкМ трихлорфон	0	50	5
50мкМ трихлорфон	0	70	25
1мМ трихлорфон	0	100	85
100 мкМ карбофуран	0	100	50
10мкМ Ag^+	0	3	25
50 мкМ Ag^+	10	7	70
10 мкМ Hg^{2+}	15	3	10
50 мкМ Hg^{2+}	40	7	70
Суміш № 1	20	100	30
Суміш № 3	95	100	90
Суміш № 4	100	100	100
Суміш № 2	*30*	*100*	*35*

Примітка Вміст токсинів у сумішах:
Суміш № 1 10 мкМ Ag^+ + 10 мкМ Hg^{2+} + 10 мкМ трихлорфон + 10 мкМ карбофуран
Суміш № 3 50 мкМ Ag^+ + 20 мкМ Hg^{2+} + 50 мкМ трихлорфон + 20 мкМ карбофуран
Суміш № 4 50 мкМ Ag^+ + 50 мкМ Hg^{2+} + 50 мкМ трихлорфон + 50 мкМ карбофуран
Суміш № 2 – умовно невідома суміш токсичних речовин

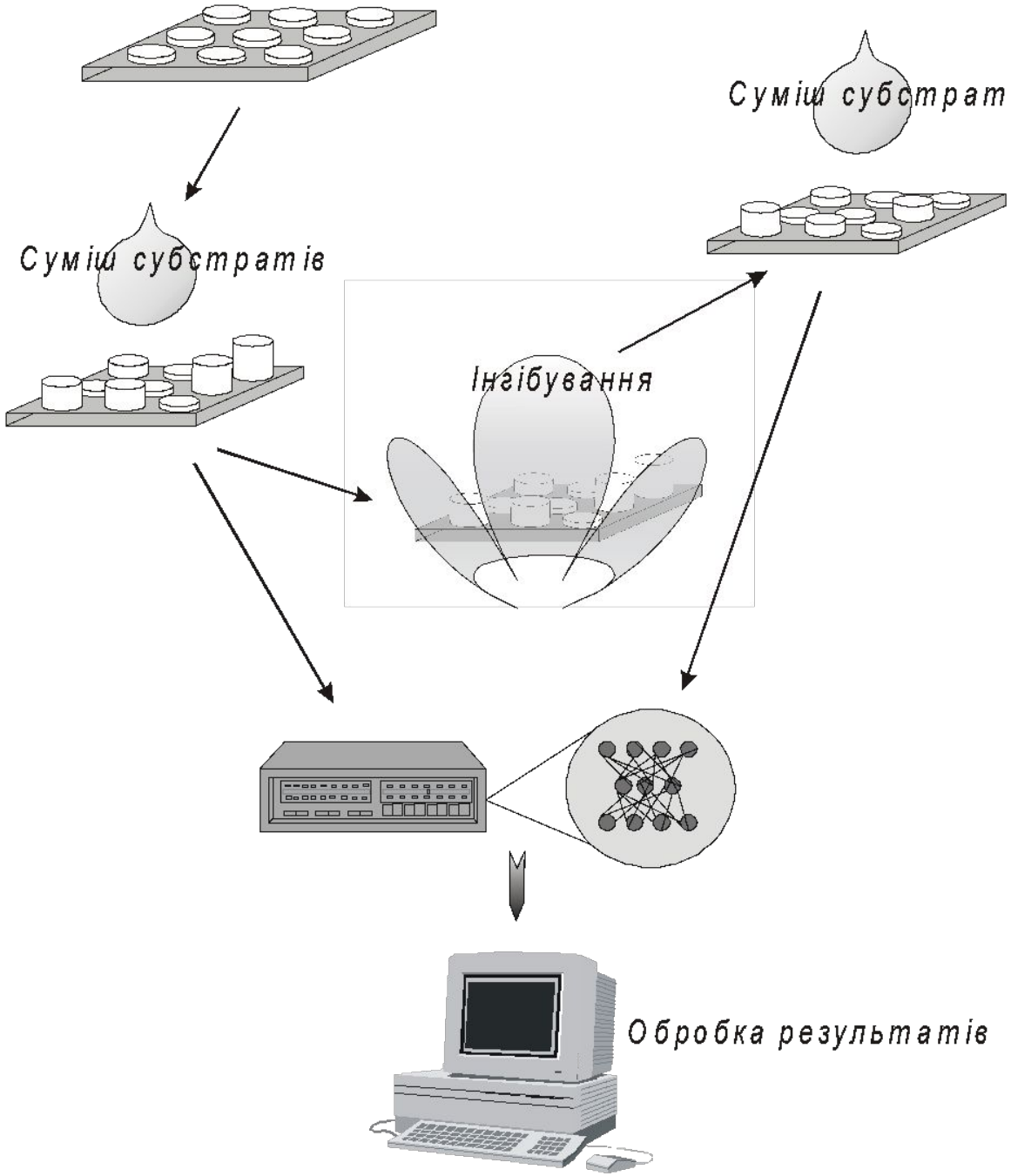
Для кількісного визначення суміші токсичних речовин у досліджуваній пробі користувалися <u>дискримінантним функціональним аналізом</u>. У цьому випадку виконували попередні експерименти з інгібування ферментів не тільки окремими токсичними речовинами, але й різними їхніми сумішами. Отримані результати заносилися до таблиці-матриці, що містила дані щодо ступеня інгібування ферментів різними токсичними речовинами та їхніми сумішами. Змінними для математичної обробки в цьому випадку є ферменти.

Спершу необхідно було нормалізувати дані. Для цього застосовується дискримінантна функція – лінійна комбінація векторів ознак, що характеризують об'єкт і якнайкраще розрізняють сукупність вибраних точок. За допомогою спеціального математичного пакету комп'ютерних програм для дискримінантного аналізу Sirius 6.0 for Windows (Pattern Recognition Systems A/S, Норвегія) отримали дискримінантні функції як лінійні суперпозиції незалежних змінних.

Нормалізація даних таблиці за допомогою дискримінантних функцій



Найбільш точне кількісне визначення складу суміші отримується за допомогою самонавчального <u>методу штучних нейронних мереж</u>. У цьому випадку сукупність вихідних параметрів (вхідні нормалізовані дані) надходять до спеціальних пристроїв обробки (штучні нейрони), які здійснюють порівняння і нормалізацію вхідних даних, використовуючи спеціальні функції, що постійно адаптуються впродовж роботи (навчання). Зважені значення підсумовуються, після чого за допомогою активаційної функції формується вихідний сигнал нейрону. Вихідні сигнали всіх нейронів, що формують даний шар, є вхідними сигналами для кожного наступного шару. В результаті обробки створюється вихідний шар з кількістю нейронів, що відповідає кількості токсичних речовин, що визначаються. Застосовуючи такий метод, можна проводити точний розрахунок складу суміші.



Узагальнена схема визначення токсичних речовин за допомогою мультибіосенсора на основі ферментного інгібіторного аналізу

Проблеми створення мультисенсорів

Всі ферменти, що використовуються, повинні функціонувати одночасно в одних і тих же умовах.
Стабільність кожного окремого фермента.
Ціна окремих препаратів ферментів залишається дуже високою.

Використання мікроорганізмів може призвести до вирішення частини проблем.

Вони можуть бути використані як природні мультиферментні системи, які функціонують в оптимальних умовах.
Можлива оцінка впливу на їх властивості різних токсикологічних ефектів забруднювачів.

Використання мікроорганізмів як природних мультиферментних систем

Електрохімічні біосенсори на основі зелених мікроводоростей *Chlorella vulgaris*

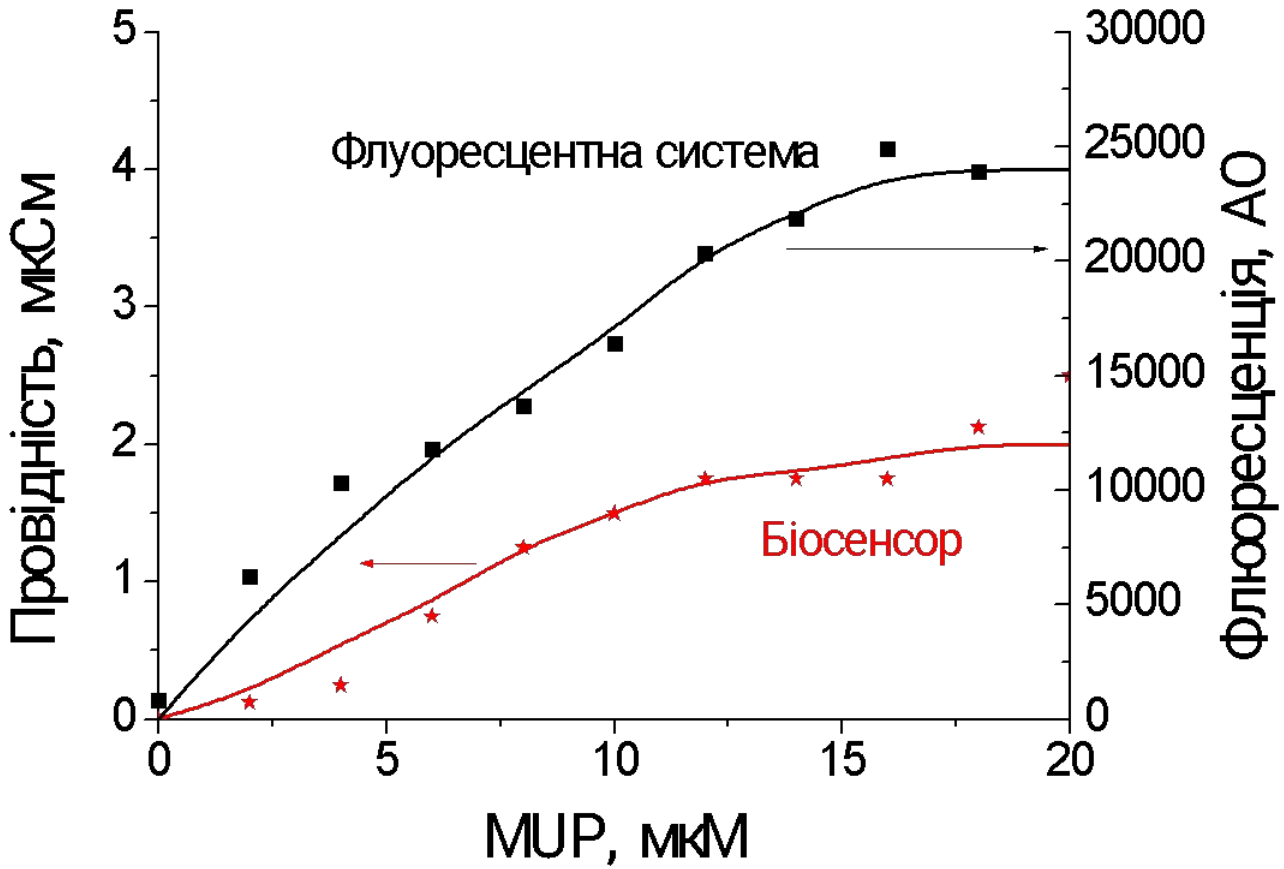
Мікроводорості *Chlorella vulgaris* можна розглядати як природні мультиферментні системи, за допомогою яких після їхньої оптимізації можна визначати токсичні речовини. При цьому функціонують вони в своїх природніх умовах. До того ж завдяки використанню живих організмів можлива оцінка впливу на їхні властивості екотоксикологічних ефектів різних забруднювачів.

Принцип роботи біосенсора на основі зелених мікроводоростей *Chlorella vulgaris* базується на такій ферментативній реакції:

$$\text{субстрат} \xrightarrow{\text{фосфатаза}} \text{продукт} + PO_4^- + H^+$$

В ході реакції продукуються протони та іони, що дає можливість використати для створення біосенсорів кондуктометричні чи потенціометричні перетворювачі.

Калібрувальні криві для визначення 4-метилумбелліферил-фосфату, отримані за допомогою флуоресцентної біосистеми і кондуктометричного біосенсора

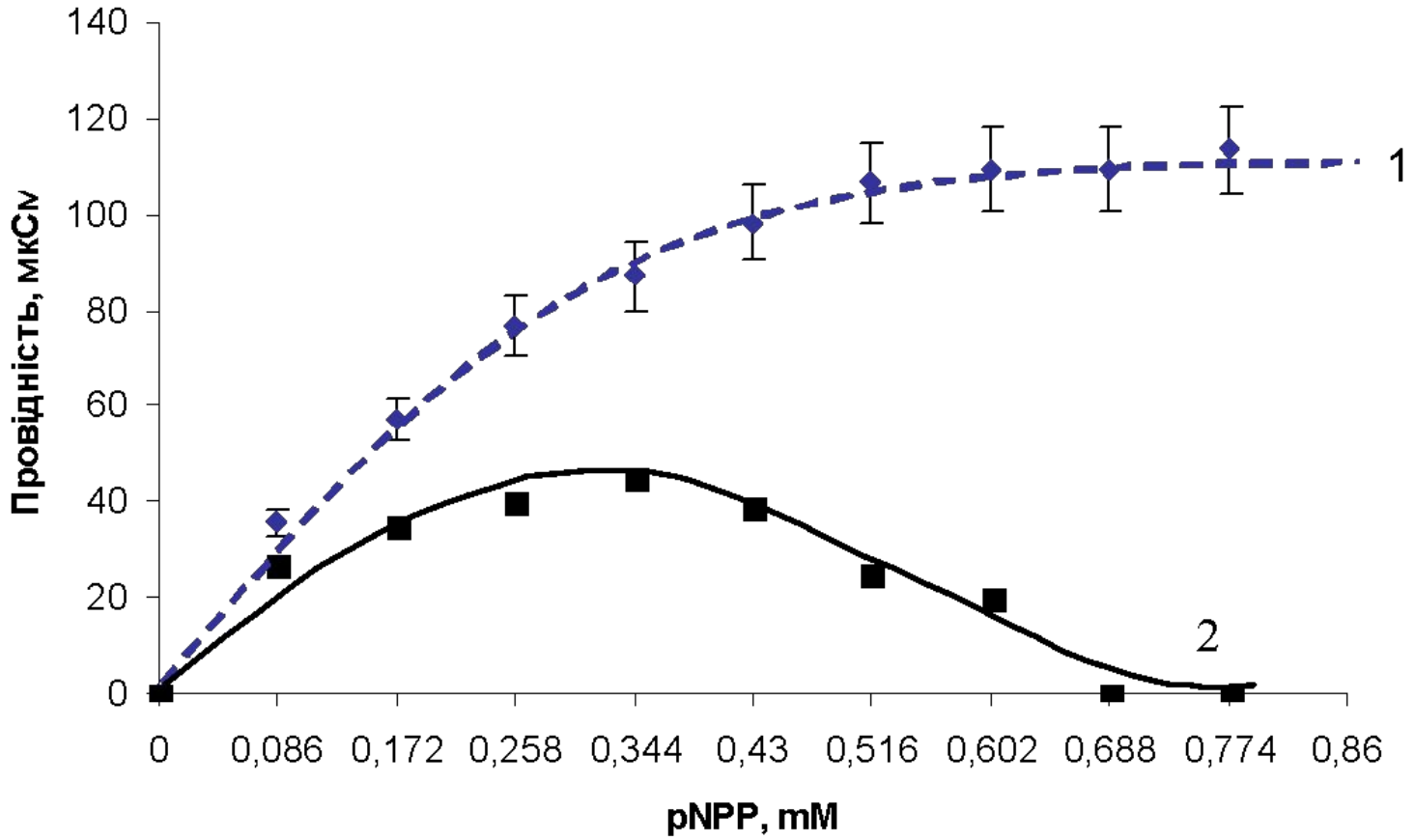


Вимірювання лужної фосфатазної активності проводили в Tris-HCl буфері, pH 8,5 з 1 мМ $MgCl_2$. Концентрація, субстрату була 1 мМ для біосенсора і 10 мМ для флуоресцентної біосистеми.

Порівняння pNPP і MUP як субстратів для застосування в біосенсорах для вимірювання лужної фосфатазної активності.

	Діапазон концентрацій	Чутливість	Тривалість відгуку
pNPP	0-1 мМ	100 мкСм/мМ	<5 хв
MUP	0-20 мкМ	0.1 мкСм/мкМ	<5 хв

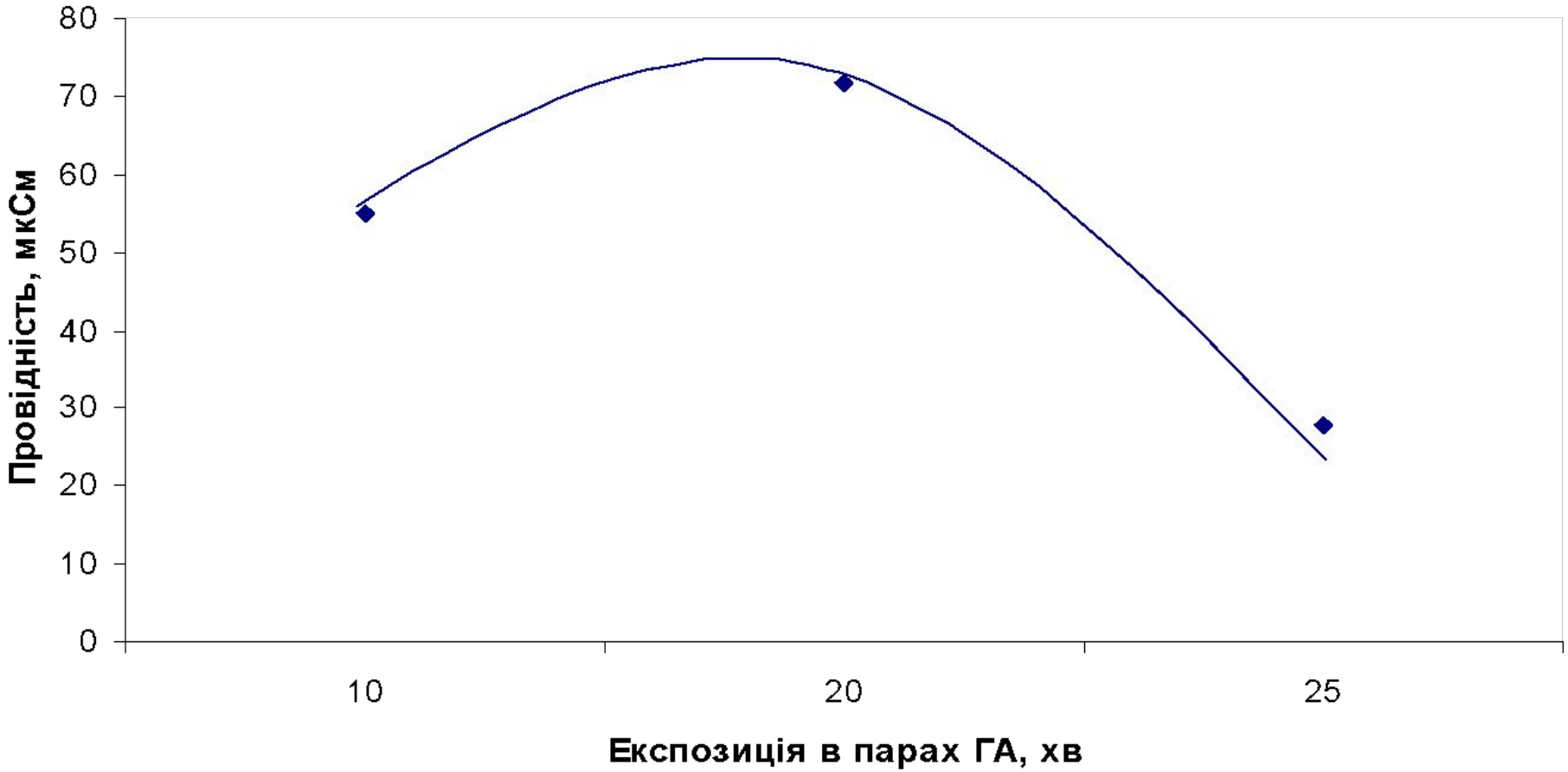
Калібрувальні криві для визначення pNPP, отримані за допомогою кондуктометричного біосенсора з БСА (1) і кальцій-альгінатною (2) мембранами.



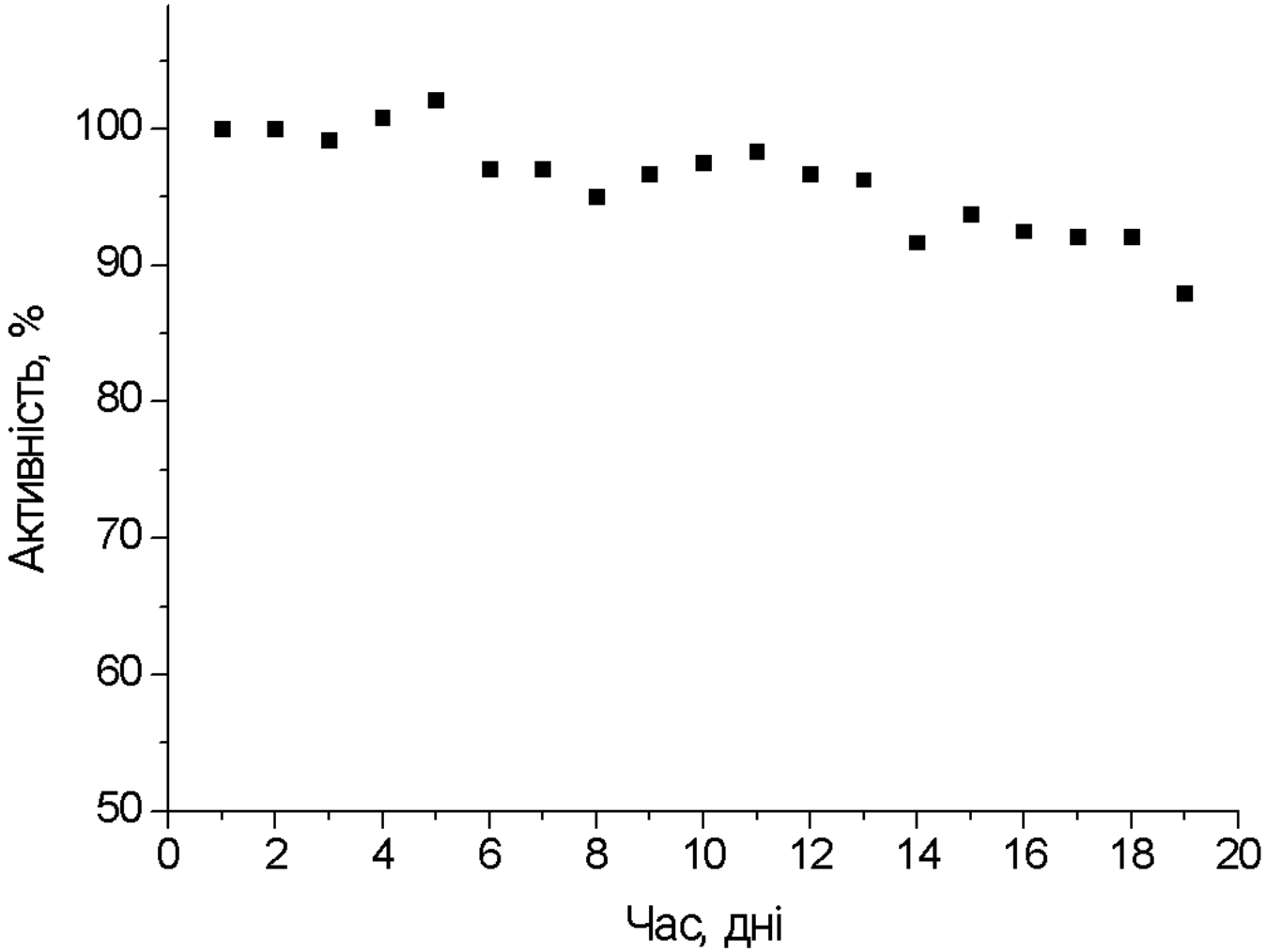
Як показано на Рис., сигнал біосенсора на основі кальцій-альгінатної мембрани зменшується при високих концентраціях pNPP (>0.3 мМ), на відміну від сигналу біосенсора на основі БСА мембрани, який має явно виражений кінетичний показник Міхаеліса з рівнем насичення від 0,5 мМ pNPP.

Таке зменшення величини відгуку біосенсора з альгінатною мембраною можна пояснити тим, що катіонові хелатні агенти, такі як фосфат, можуть викликати руйнування або розчинення альгінатної матриці, а в результаті ферментативної реакції за участю лужної фосфатази продукуються іони фосфату. Також було показано, що мембрани з альгінату кальцію були стабільні при pH до 5,5 і низьких концентраціях фосфату, проте при підвищенні pH і концентрацій ступінь розчинення збільшувався. В нашому випадку, лужну фосфатазну активність вимірювали при pH 8,5, який знаходиться явно поза діапазоном оптимальної стабільності pH для альгінатного гелю. Отже, мембрани з альгінату кальцію є непридатними для створення біосенсорів на основі мікроводоростей.

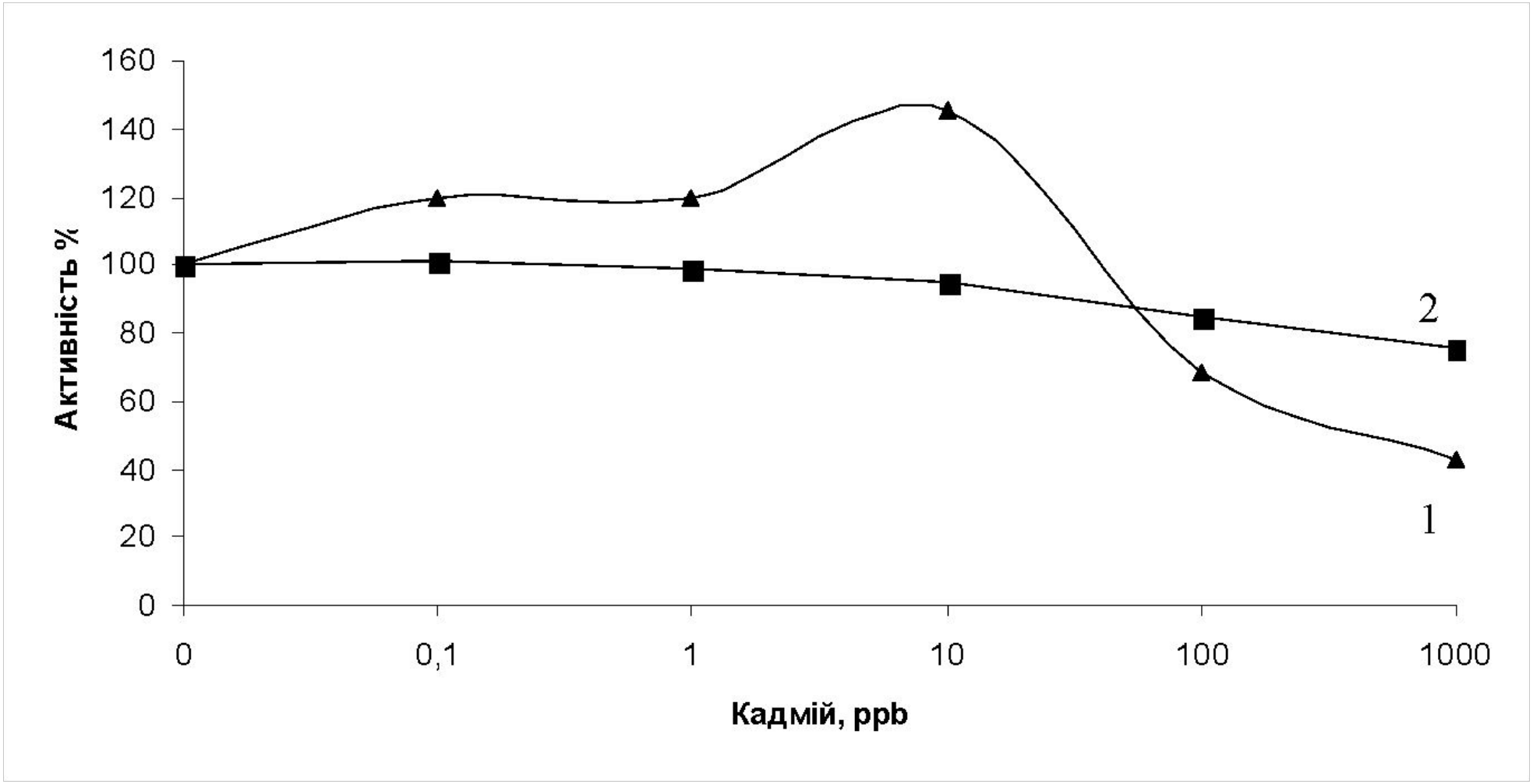
Залежність відгуку кондуктометричного біосенсора на додавання 40 мМ pNPP від часу експонування в парах глутарового альдегіду при іммобілізації водоростей



Стабільність кондуктометричного біосенсора на основі зелених водоростей *Chlorella vulgaris*.



Відносне значення лужної фосфатазної активності, визначеної за допомогою кондуктометричного біосенсора (1) і флуоресцентної біосистеми (2) негайно після контакту з кадмієм у різних концентраціях.



В обох випадках для малих концентрацій кадмію (<10 ppb) можна спостерігати невелике підвищення відгуку, в той же час лужна фосфатазна активність інгібується високими концентраціями кадмію. Така активація деяких ферментів при низьких концентраціях кадмію вивчалася при тривалому експонуванні (>1 години) іншими авторами, які пояснюють її клітинним стресом. В цьому випадку, щоб запобігти руйнуванню клітини кадмієм, в клітині виробляються промотори стресу, що підвищують активність ферментів.

Порівняння інгібування лужної фосфатазної активності кадмієм для біосенсорів і флуоресцентної біосистеми.

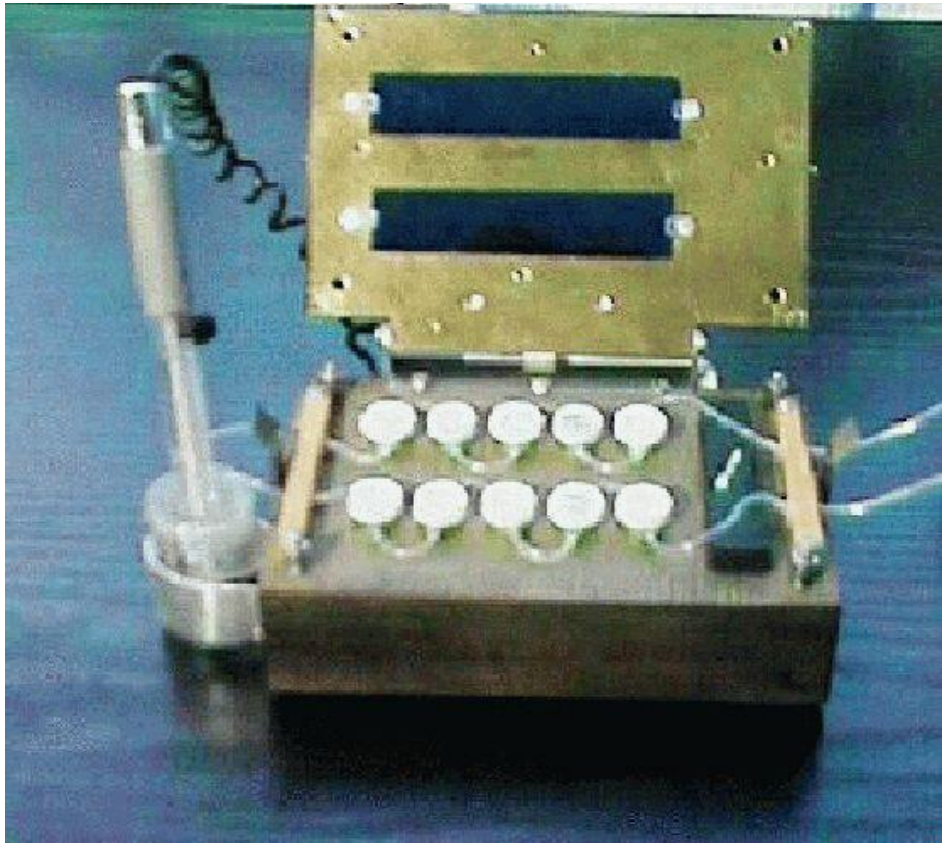
Тривалість експонування з кадмієм	Флуоресцентна біосистема, %		Кондуктометричні біосенсори, %	
	10 ppb	100 ppb	10 ppb	100 ppb
1 година	100	100	>70	0
2 години	95	90	30-50	0
4 години	80	65	0	0

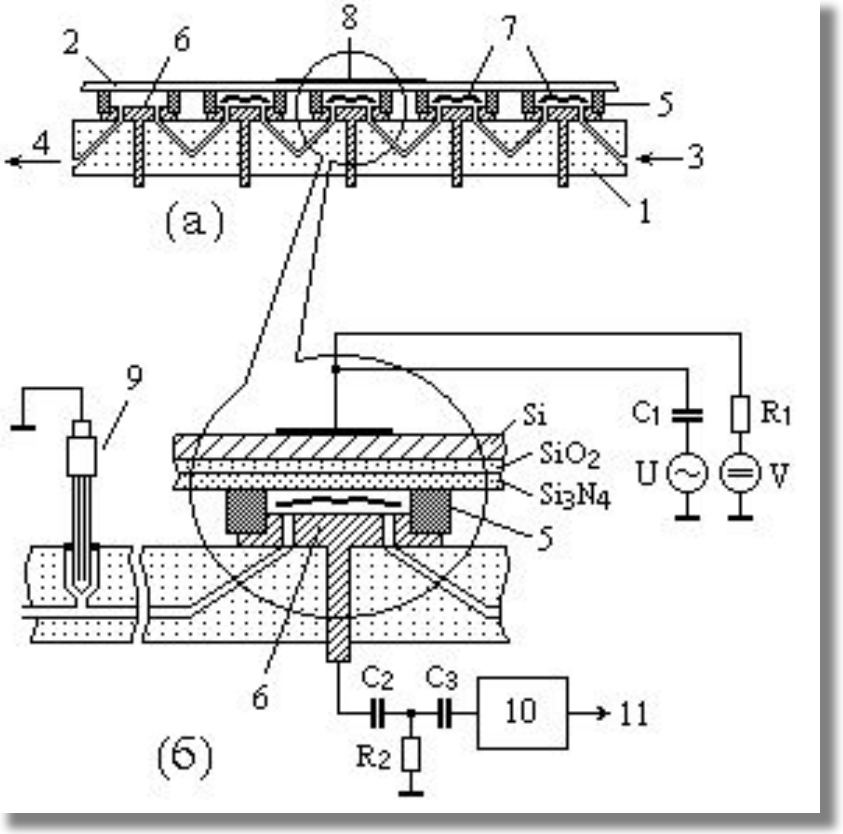
При тривалому експонуванні спостерігали більш швидке інгібування, отримане за допомогою біосенсорів, ніж флуоресцентої біосистеми. Те ж саме можна сказати про збільшення інгібування для високих концентрацій кадмію при короткому експонуванні. Це можна пояснити різним співвідношенням кількості клітин водоростей і кадмію в цих двох випадках. Справді, в мембранах іммобілізується невелика кількість водоростей у порівнянні з біосистемами із застосуванням вільних водоростей. В біосенсорах відношення водорості/кадмій є меншим, ніж у біосистемах, а швидкість інгібування зворотньо пропорційна до цього співвідношення. Внаслідок цього, біосенсори забезпечують більш високі швидкості інгібування і тому чутливіші при визначенні токсинів.

Показано, що за допомогою такої мультиферментної системи можна вивчати лужну фосфатазну активність *Chlorella vulgaris* та вплив на цю активність іонів важких металів, зокрема, іонів кадмію. Також показано, що для створення таких біосенсорів більш придатні кондуктометричні перетворювачі.

Продемонстровано кореляцію результатів, отриманих за допомогою кондуктометричного біосенсора на основі зелених мікроводоростей *Chlorella vulgaris* та біосистеми на основі визначення флуоресценції.

Мульти-ферментна електрохімічна система для експресної діагностики токсичних речовин

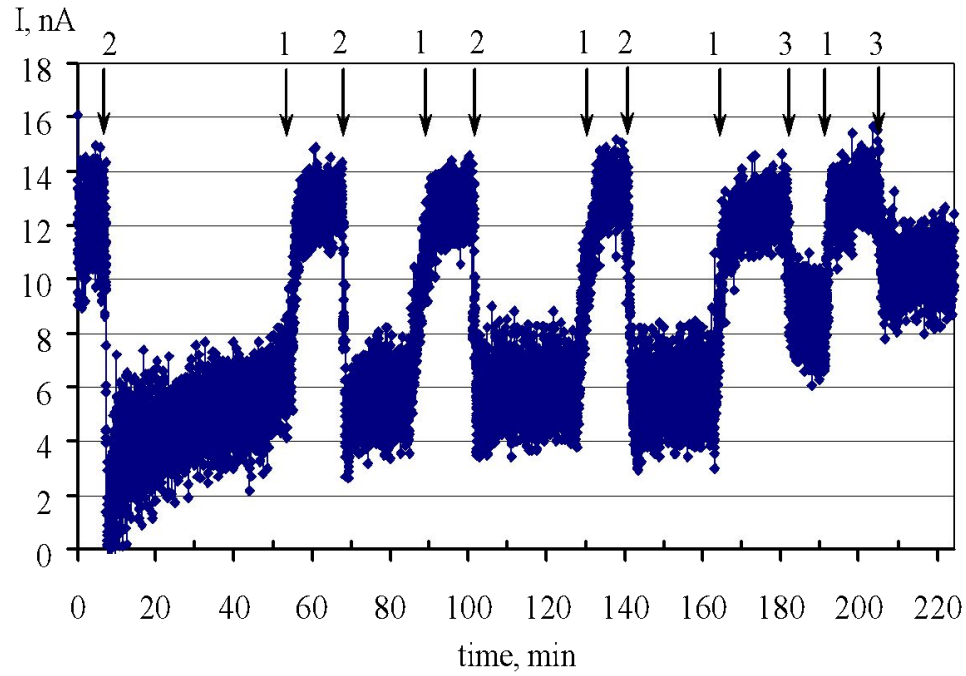




Селективна мембрана – бутирил холінестераза, ацетилхолінестераза, уреаза

Перетворювач – ємнісний датчик на основі польового ефекту

Мульти-параметричний амперометричний біосенсор

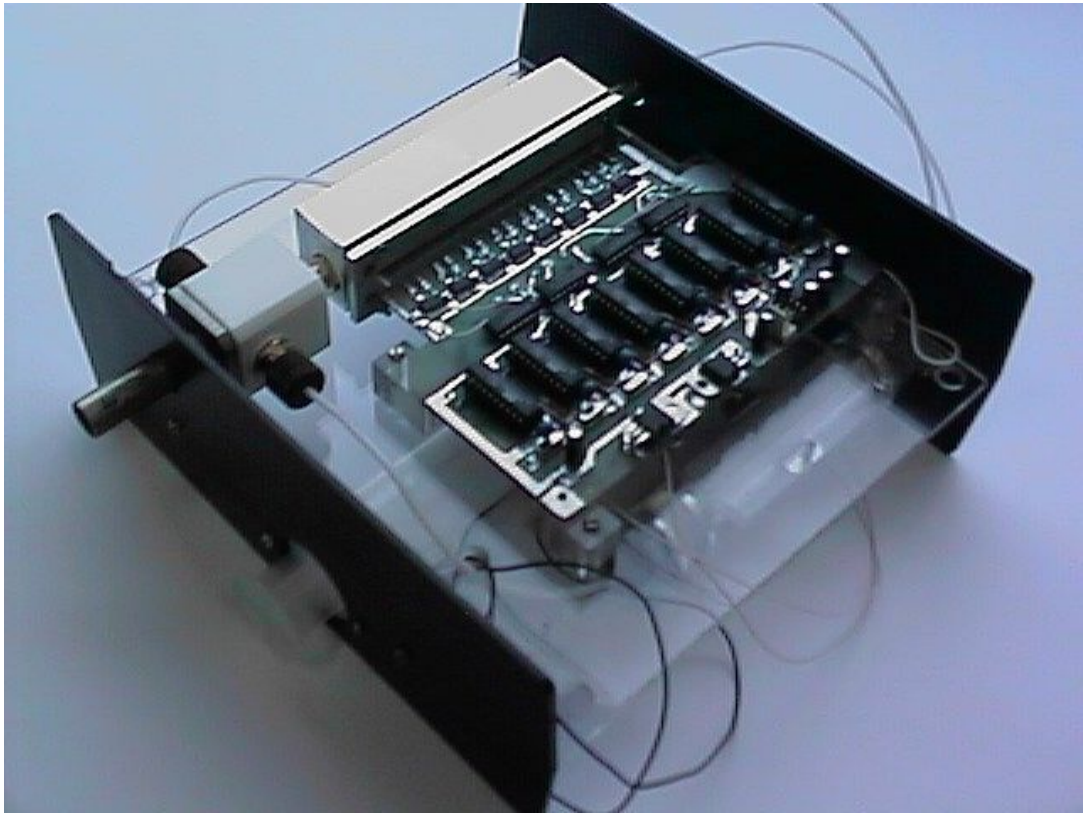


Відгук біосенсора на 10 мМ фосфатний буферний розчин (1), 1 % глюкози (2) та 0,1 % глюкози (3) в комірці.

Селективна мембрана – глюкозооксидаза, лактат оксидаза, алкоголь оксидаза

Перетворювач – амперометричний вуглецевий планарний друкований електрод

Електронний ніс ГАЗ-1
Розпізнавання хімічних образів

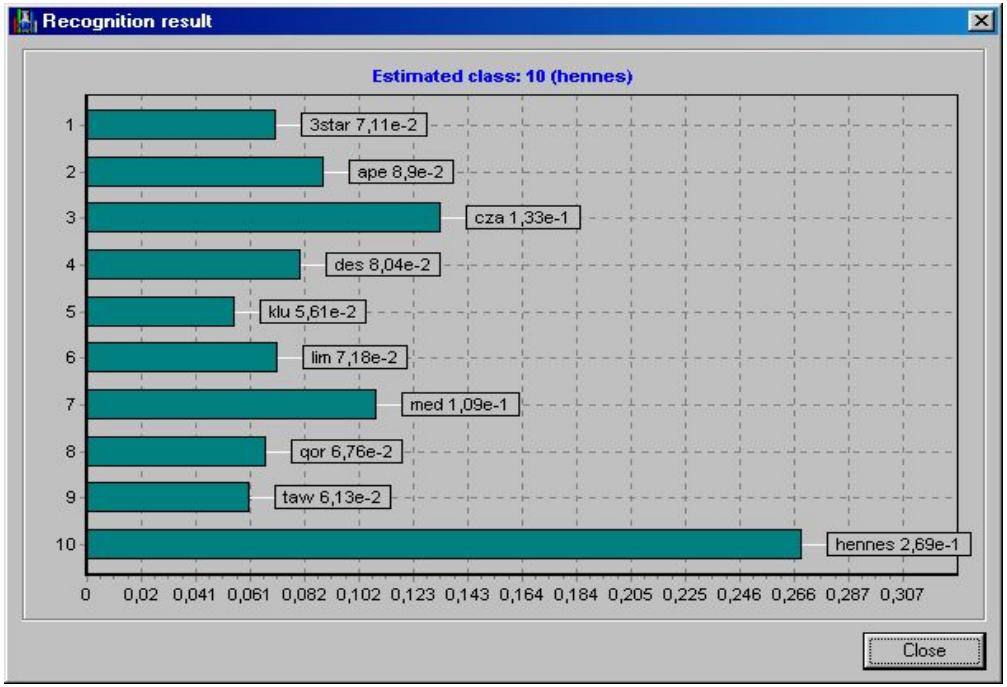


Селективна мембрана – каліксарени, полімери

Перетворювач – кварцеві резонатори

Масив сенсорів (8) являє собою набір кварцевих резонаторів, поверхя кожного з яких вкрита тонким шаром абсорбуючої речовини (каліксарени, полімери, тощо). Він приводиться в контакт з аналізованою газовою сумішшю, в результаті чого чутливі шари вбирають певну кількість газу. Завдяки різниці до адсорбції різних молекул, що реєструються, частота кварцевих резонаторів зменшується по-різному. В результаті можна створити багатовимірну базу даних та навчити систему відрізняти один хімічний склад від іншого, тобто реєструвати запах газового середовища. Для математичної обробки даних та розпізнавання використовується кілька алгоритмів.

В цей отвір вводиться газ для аналізу



Результат розпізнавання – максимальне значення відповідає речовині, що розпізнається (в даному випадку – коньяк Хеннесі)