



Государственный комитет
СССР
по делам изобретений
и открытий

О П И С А Н И Е ИЗОБРЕТЕНИЯ

К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(11) 891774

(61) Дополнительное к авт. свид-ву -

(22) Заявлено 20.12.79 (21) 2856250/23-04

с присоединением заявки № -

(23) Приоритет -

Опубликовано 23.12.81. Бюллетень № 47

Дата опубликования описания 23.12.81

(51) М. Кл.³

С 12 N 9/02
С 25 В 11/12

(53) УДК 542.8;
577.15.07
(088.8)

(72) Авторы
изобретения

Ю.Ю. Кулис, В.-С.А. Лауринавичюс, А.А. Малинаускас,
М.В. Песлякене, А.С. Самалюс и Г.-Ю.С. Швиришас

(71) Заявитель

Институт биохимии АН Литовской ССР

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ,
ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К МЕТАБОЛИТАМ

Изобретение относится к энзимологии, конкретно к получению ферментных электродов, и может быть использовано в целях анализа, синтеза электрохимическим способом органических соединений или в биотопливных элементах.

Известны способы получения биоэлектродов, в которых осуществляется прямой обмен электронов между активным центром белков и электродами. Например, цитохром С, адсорбированный на ртути, платине или золоте, может восстанавливаться электрохимическим путем [1].

Однако данные системы не содержат биокатализаторов и не могут быть использованы для получения ферментного электрода.

Известен способ получения лакказного электрода, восстанавливающего кислород, путем адсорбции фермента на углеродистых материалах [2].

Недостатком данного способа является то, что он не применим для получения ферментных электродов на основе других ферментов, катализирующих превращение продуктов метаболизма живого организма.

Практически важными являются ферментные электроды, чувствительные к метаболитам - глюкозе, лактату, перекиси водорода, мочевой кислоте, аминокислотам, ксантину, холестерину и др. веществам. Используя такие электроды, создают безреагентные методы анализа и полностью безреагентные электроды, пригодные для анализа метаболитов *in vivo*, системы электросинтеза соединений, в частности аминокислот, а также биотопливные элементы, которые служат в качестве имплантируемых в организме датчиков и источников тока.

Однако адсорбция ферментов, катализирующих превращение перечисленных метаболитов на углеродистых материалах

лах, не обеспечивает создание ферментных электродов, вследствие чего перенос электронов с активных центров флавин- и гем- и металлсодержащих (за исключением Cu-содержащих) ферментов на углеродные электроды не протекает.

Известны способы получения ферментных электродов, чувствительных к метаболитам, на основе глюкозооксидазы, лактатдегидрогеназы, оксидазы L- и D-аминокислот, уреазы и др., сущность которых сводится к иммобилизации фермента в геле, нанесению геля на электрод и снабжению его диализной пленкой для предотвращения диффузии фермента в раствор [3].

Наиболее близким к предлагаемому является способ получения ферментного электрода на основе глюкозооксидазы, заключающийся в том, что фермент, иммобилизованный в геле, наносят на платиновый электрод и покрывают диализной (целлофановой) пленкой [4] и [5].

Недостатком известных способов является сложность технологии получения ферментных электродов, а также то, что в аналитических реакциях определения метаболитов, полученные таким способом, ферментные электроды могут использоваться только при наличии особых веществ-медиаторов, служащих для переноса электронов с активного центра фермента на проводник - Pt электрод. Таким образом, генерация тока в системе и работа электрода возможны лишь в присутствии медиаторов, в качестве таковых обычно используются бензохинон, феррицианид или кислород. Поскольку два первых являются ядовитыми веществами, то работа с электродами данного типа требует использования опасных для жизни веществ и, кроме того, невозможна в анаэробной среде.

Цель изобретения - упрощение процесса получения и улучшение свойств ферментных электродов.

Указанная цель достигается способом получения ферментных электродов, заключающимся в том, что фермент адсорбируют на органическом электроде, представляющем собой комплекс органических катионов - метилированных производных феназина, акридина, хинолина, пиридина, дипиридина и анион-радикала 7,7,8,8-тетрациан-п-хинодиметана, и процесс проводят в

растворе при концентрации фермента 10^{-8} - 10^{-5} моль/л, температуре 4-25°C и pH 7,0-7,2 в течение 0,5-15 ч.

В качестве ферментов используют гем-, флавин- и металлсодержащие ферменты: глюкозооксидазу, пероксидазу, лактатдегидрогеназу, оксидазу D- и L-аминокислот, ксантинооксидазу, диафоруазу, уриказу и холестериноксидазу.

Электролиз проводится в интервале потенциалов от 0,6 до 0,05 В (относительно насыщенного серебряного электрода). Это обеспечивает возможность создания новых ферментных электродов с использованием гем-, металл- и флавиносодержащих ферментов. Используемые органические комплексы обладают не полупроводниковой, а металлической электропроводностью.

Предлагаемый способ позволяет изготовить электроды, генерирующие ток в присутствии глюкозы, лактата, аминокислот, мочевой кислоты и др. метаболитов и обладающие селективностью только к этим веществам.

На чертеже показана схема ферментного электрода.

Схема содержит органический металл 1 с адсорбированным ферментом, тефлоновый корпус 2, медная (А) или платиновая (Б) проволока 3, эпоксидный компаунд 4, эвтектический припой 5, платиновый, титановый или стеклоуглеродный токоотводящий электрод 6, диализная мембрана 7, резиновое кольцо 8.

Способ осуществляют следующим образом.

0,1 г соли метилированного производного одного из указанных ароматических соединений растворяют в 5-20 мл горячего абсолютного этилового спирта и к нему добавляют горячий раствор 0,1 г (0,05 М) литиевой соли анионрадикала 7,7,8,8-тетрациан-п-хинодиметана в 10 мл этилового спирта. Выпавший осадок промывают эфиром и высушивают в вакуум-эксихаторе.

Полученные порошки черного цвета прессуют под давлением 10 т. К полученным таблеткам ϕ 2 мм, толщиной 0,5-1 мм припаивают токоотводящий электрод и монтируют их в тефлоновый корпус таким образом, чтобы с электролитом контактировал только органический проводник (чертеж, А). Подготовленный электрод погружают в раствор высокоочищенного фермента, кон-

центрация которого 10^{-8} – 10^{-5} моль/л (0,004–1,5 мг/мл) в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,2 и выдерживают в течение 0,5–15 ч при 15–20°C. После этого электроды промывают тем же буферным раствором (4–20 мл).

При изготовлении других ферментных электродов 1,0–1,2 мг комплекса добавляют в 3–4 моль/л раствора фермента, содержащего 0,1 мг белка. Суспензия захватывается на токоотводящем электроде, изготовленном из платины, стеклоуглерода или титана, при помощи диализной мембраны (чертеж, Б). Измерение тока электрода проводится в трехэлектродной схеме в анаэробных условиях в том же буфере.

В основе механизма присоединения фермента к органическому комплексу лежит адсорбция белка на гетерогенных поверхностях, обусловленная ионными и вандерваальсовскими силами взаимодействия. Адсорбция фермента на органическом комплексе протекает практически необратимо.

Пример 1. Электрод, изготовленный из 24 мг комплекса N-метилфеназина (НМФ) и анион-радикала 7,7,8,8-тетрациан-п-хинодимертана (ТЦХМ), погружают в 2 мл раствора кристаллической глюкозооксидазы Pen.vitale в 0,1 М фосфатном буфере. Концентрация фермента 10^{-5} моль/л (15 мг/мл). Электрод выдерживают в растворе фермента при комнатной температуре (15–20°C) в течение 15 ч. Промывают электрод фосфатным буфером по 20 мл и подключают к полярографу. Определяют стационарный анодный ток электрода, который устанавливается в течение 1 мин при разных концентрациях глюкозы.

Зависимость анодного тока окисления глюкозы адсорбированной на комплексе НМФ⁺ ТЦХМ[−] глюкозооксидазы (pH 7,2 0,1 М фосфатный буфер, 25°C) приведена в табл.1. Электрод сохраняет высокую стабильность во времени.

Зависимость тока глюкозооксидазного электрода при непрерывной его работе в течение продолжительного времени (концентрация глюкозы 2,55 мМ, др., условия как в табл.1) приведена в табл.2.

Чувствительность электрода в начале увеличивается и в дальнейшем сохраняется на постоянном уровне в

течение 10 dni непрерывной работы и более.

Т а б л и ц а 1

5	Потенциал анода относительно насыщенного хлор-серебряного электрода, В	Концентрация глюкозы, мМ	Ток электрода, мКА
10	0,078	0	0
15	0,078	1,0	0,30
		2,0	0,65
		3,0	0,98
		4,0	1,30
20		5,0	1,38
		6,0	1,40
	0,60	0	0
25		1,0	0,5
		2,0	1,02
		3,0	1,55
30		4,0	2,0
		5,0	2,5
		6,0	2,65
		7,0	2,76
35		8,0	2,84
		9,0	2,88
		10,0	3,0
40		11,0	3,16
		12,0	3,20
		13,0	3,28

Т а б л и ц а 2

45	Время работы, сут	Ток электрода, мКА
50	1	2
	0	0,53
	1	0,67
55	2	1,05
	3	1,0
	4	0,90

Продолжение табл. 2

1	2
5	0,90
6	1,04
7	1,0
8	0,98
9	1,0
10	1,0

Пример 2. Электрод изготавливают из 26 мг комплекса состава $\text{MMO}^+\text{TICX}^-$ и погружают в раствор высокоочищенной пероксидазы из хрена в 0,1 М фосфатном буфере. Концентрация фермента 10^{-8} моль/л ($4 \cdot 10^{-4}$ мг/мл). Адсорбция проводится в течение 25-30 мин при 20°C . Ферментный электрод пропитывают фосфатным буфером и проводят определение тока электрода в зависимости от концентрации перекиси водорода.

Зависимость катодного тока восстановления перекиси водорода адсорбированной на комплексе $\text{MMO}^+\text{TICX}^-$ пероксидазой (20°C , $\text{pH}=7,0$, 0,1 М фосфатный буфер) показана в табл.3.

Электрод сохраняет работоспособность в течение суток. Когда на комплексе захватывается раствор пероксидазы (0,1 мг/мл) при помощи диализной мембраны, электрод сохраняет активность более, чем в течение месяца.

Т а б л и ц а 3

Потенциал катода относительно насыщенного хлор-серебряного электрода, В	Концентрация перекиси водорода, мм	Ток электрода, мкА
1	2	3
-0,05	0,5	2,56
	1,0	4,72
	1,5	6,32
	2,0	7,52
	2,5	8,80
	3,0	9,60
	3,5	10,32

Продолжение табл.3

1	2	3
0,0	0,5	2,40
	1,0	4,72
	1,5	6,40
	2,0	7,92
	2,5	9,04
	3,0	9,76
	3,5	10,40
0,05	0,5	2,64
	1,0	5,04
	1,5	6,88
	2,0	8,32
	2,5	9,52
	3,0	10,48
0,10	0,5	2,48
	1,0	4,80
	2,5	6,72
	2,0	8,64
	2,5	10,16
	3,0	11,68
	3,5	12,80
	4,0	13,84
+0,15	0,5	2,24
	1,0	3,80
	1,5	5,04
	2,0	5,96
	2,5	6,72
	3,0	7,32
	3,5	7,72
+0,20	0,5	1,70
	1,0	2,56
	1,5	3,08
	2,0	3,28
	2,5	3,42
	3,0	3,52
	3,5	3,58

Пример 3. 1 мл комплекса состава $\text{NMФ}^+ \text{ТЦХМ}^-$ добавляют в 3 мл 0,1 М фосфатного буфера при pH 7,2 и температуре 20°C, содержащего 0,1 мг цитохрома b_2 активностью 70 ед/мг, выделенной из дрожжей "Hansenula anomala". Полученную суспензию наносят на токоотводящий электрод (платиновый или из стеклоглерида) и закрывают полупроницаемой мембраной.

На электрод подается потенциал в интервале 0,3-0,4 В (относительно Ag/AgCl электрода сравнения) и измеряется зависимость стационарного тока после 1 мин при добавлении D-, L-лактата.

Зависимость тока анодного окисления лактата адсорбированного на комплексе $\text{NMФ}^+ \text{ТЦХМ}^-$ цитохрома b_2 (20°C, pH 7,2, 0,1 М фосфатного буфера) приведена в табл.4.

Т а б л и ц а 4

Потенциал анода, В	Концентрация D-, L-лактата, мМ	Ток электрода, мкА
0,04	0	0
	0,05	0,10
	0,15	0,24
	0,34	0,60
	0,64	0,88
	0,93	1,08
	1,52	1,32
0,4	0	0
	0,05	0,08
	0,15	0,28
	0,24	0,46
	0,54	0,92
	0,84	1,28
	0,72	1,92
	2,90	2,40

Пример 4. 1,2 мг комплекса состава $\text{NMФ}^+ (\text{ТЦХМ}^-)_2$ добавляют в 4 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH которого 7,2 при 20°C, содержащего 0,1 мг цитохрома b_2 . Другие операции аналогичны примеру 3.

Зависимость тока анодного окисления лактата, адсорбированного на комплексе $\text{NMФ}^+ (\text{ТЦХМ}^-)_2$ цитохрома b_2 (20°C, pH 7,2 0,1 М фосфатный буфер), приведена в табл.5.

Т а б л и ц а 5

Потенциал анода, В	Концентрация D-, L-лактата, мМ	Ток электрода, мкА
0,4	0	0
	0,05	0,08
	0,15	0,24
	0,24	0,68
	0,54	1,20
	0,84	1,68
	1,13	2,12
	1,42	2,48

Зависимость тока ферментного электрода - цитохром b $\text{NMФ}^+ (\text{ТЦХМ}^-)_2$ от температуры (потенциал анода 0,1 В, концентрация D-, L-лактата 3,57 мМ, 0,1 М фосфатный буфер), приведена в табл.6.

Т а б л и ц а 6

Температура, °C	Ток электрода, мкА
1	2
14	0,680
15	0,696
16	0,720
17	0,760
18	0,824
19	0,896
20	0,960
21	1,024
22	1,080
23	1,136
24	1,192
25	1,248

(комплекс $\text{NMФ}^+\text{ТЦХМ}^-$, рН 7,2, 0,1 М фосфатный буфер, 25°C, потенциал электрода 0 В) приведена в табл.7.

Т а б л и ц а 7

1	2
26	1,312
27	1,368
28	1,416
29	1,456
30	1,496
31	1,520
32	1,544
33	1,552
34	1,512
35	1,472
36	1,392
37	1,320
38	1,232
39	1,112
40	0,976
41	0,848
42	0,696
43	0,568
44	0,448
45	0,376
46	0,272
47	0,232
48	0,200

Пр и м е р 5. Таблетку прессуют из 12 мг комплекса $\text{NMФ}^+\text{ТЦХМ}^-$ диаметром 2 мм и толщиной около 0,5 мм, выкладывают на торец электрода, изготовленного из впаянной в стекло и отшлифованной титановой проволоки.

Комплекс прижимают к электроду при помощи капроновой сетки (толщина нитей 0,1 мм, 160 меш). На сетку наносят 0,1 мм раствора глюкозооксидазы (1,3 мг/мл) и раствор закрывают целлофановой мембраной. Определяют ток электрода в присутствии глюкозы.

Зависимость разностного анодного тока глюкозооксидазного электрода, в качестве токоотводящего электрода в котором служит титановая проволока

5	Концентрация глюкозы, мМ	Разностный анодный ток электрода, мкА
10	0,2	0,01
	0,4	0,05
	0,8	0,07
15	1,0	1,3
	1,2	1,65
	1,4	0,20
20	1,6	0,22
	1,8	0,23

Пр и м е р 6. 0,01 мл раствора глюкозооксидазы захватывают при помощи диализной мембраны на поверхности электрода из комплекса N-метилакридиний-ТЦХМ. Концентрация фермента $6,9 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Определяют ток электрода в зависимости от концентрации глюкозы и потенциала электрода.

Зависимость анодного тока окисления глюкозы абсорбированной на комплексе NMA ТЦХМ глюкозооксидазой от концентрации субстрата (рН 7,0, 0,1 М фосфатный буфер, 25°C, анаэробная среда) приведена в табл.8.

Т а б л и ц а 8

45	Потенциал анода относительно насыщенного хлор-серебряного электрода, В	Концентрация глюкозы, мМ	Ток электрода, мкА
50	1	2	3
	0,2	0	0
		0,28	0,10
		0,52	0,25
55		0,80	0,40
		1,0	0,45
		1,2	0,50

Продолжение табл.8

1	2	3
0,3	1,4	0,60
	1,6	0,70
	2,0	0,90
	2,6	1,02
	0	0
	0,28	0
	0,52	0,05
	0,80	0,12
	1,0	0,25
	1,2	0,40
0,1 или 0,048	1,4	0,50
	2,0	0,75
	0	0
	0,28	0,15
	0,52	0,35
	0,80	0,45
	1,0	0,50
	1,2	0,52
	1,6	0,55
	1,8	0,60
0,4	2,0	0,62
	0	0
	2,1	0,1
	2,6	0,25
	3,0	0,30
	3,2	0,35

Пример 7. 0,10-0,12 мг лиофилизированного порошка оксидазы L-аминокислоты (или уриказы, или холестериноксидазы) растворяют в 0,1 мл фосфатного буфера и раствор наносят на поверхность электрода N-метилхинолиний ТЦХМ. Раствор покрывают диализной мембраной. Электрод погружают в фосфатный буферный раствор и выдерживают в течение 0,5-1,5 ч при 25°C. Определяют ток электрода в зависимости от концентрации субстрата.

Зависимость анодного тока окисления L-лизина, адсорбированной на комплексе $\text{NMH}^+\text{ТЦХМ}^-$ оксидазой L-аминокислот от концентрации субстрата при 0,048 В относительно н.с.э. (рН 7,2, 0,1 М фосфатный буфер, 25°C, анаэробный раствор), приведена в табл.9.

Т а б л и ц а 9

Концентрация L-лизина, мМ	Ток электрода, мКА
0	0
0,21	12
0,42	26
0,63	40
1,0	52
1,5	68
2,0	72

Примечания. 1. В случае мочевиной кислоты и холестерина калибровка выполнена до 0,63 мМ субстратов. Величины токов близки по значению к току электрода на основе оксидазы аминокислот.

2. Сравнительно небольшие токи электродов обусловлены низкой активностью используемых ферментов. Активности которых равны 0,05; 0,12; 0,8 ед/мг соответственно для холестериноксидазы, уриказы и оксидазы L-аминокислот.

Пример 8. 15 мл раствора диафоразы, выделенной из митохондрий и обладающей НАДН-окислительной способностью (0,2 ед/мг), захватывают в приэлектродном слое комплекса N-метилпиридиний-ТЦХМ и проводят определения тока электрода в зависимости от концентрации субстрата.

Зависимость тока окисления НАДН, адсорбированной на комплексе $\text{NMH}^+\text{ТЦХМ}^-$ диафоразой от концентрации субстратов (потенциал анода 0,072 В относительно н.с.э., рН 7,2, 0,1 М фосфатный буфер, 25°C, анаэробный раствор), приведена в табл.10.

Т а б л и ц а 10

Концентрация НАДН, мМ	Ток электрода, мкА
0	0
0,16	25
0,32	61
0,48	92
1,2	160
1,6	205

П р и м е р 9. 10 мл раствора глюкозооксидазы (69 мМ) захватывают при помощи диализной мембраны на поверхности электрода из комплекса метилвиологен - ТЦХМ, определяют ток электрода в зависимости от концентрации глюкозы.

Зависимость тока окисления глюкозы, адсорбированной на МВ ТЦХМ глюкозооксидазой от концентрации субстрата (0,048 В относительно н.с.э., другие условия, как в табл.3), приведена в табл.11.

Т а б л и ц а 11

Концентрация глюкозы, мМ	Ток электрода, мкА
0	0
0,2	0,01
0,3	0,03
0,5	0,06
0,8	0,15
1,1	0,22
1,5	0,31
1,9	0,41

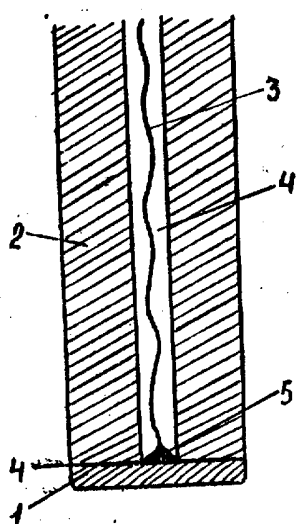
Формула изобретения

1. Способ получения ферментных электродов, чувствительных к метаболитам, отличающийся тем, что, с целью упрощения процесса и улучшения свойств целевого продукта, фермент адсорбируют на органическом электроде, представляющем собой комплекс органических катионов - метилированных производных феназина, акридина, хинолина, пиридина, дипиридина и анион-радикала 7,7,8,8-тетрациан-п-хинодиметана, и процесс проводят в растворе, содержащем фермент в концентрации 10^{-8} - 10^{-5} моль/л, при 4-25°C и pH 7,0-7,2 в течение 0,5-15 ч.

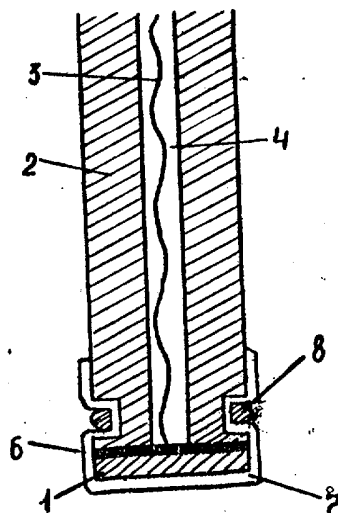
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве ферментов используют гем-, флавин- и металлосодержащие ферменты: глюкозооксидазу, пероксидазу, лактатдегидрогеназу, оксидазу D- и L-α-аминокислот, ксантиноксидазу, диафорузу, уриказу и холестериноксидазу.

Источники информации, принятые во внимание при экспертизе

1. S.R.Betso, M.H.Klapper, L.B.Anderson, J.Amer. Chem. Soc., v. 94, 1972, p. 8197.
2. Авторское свидетельство СССР по заявке № 2791581/23-26, кл. С 25 В 11/12, 1979.
3. Имобилизованные ферменты. Под ред. И.В.Березина, В.К.Антонова, К.Мартиника. М., МГУ, 1976, т. 2, с. 169-176.
4. Williams D.L., Doig A.R. Jr., Korosi A. Electrochemical Enzymatic Analysis of Blood. Glucose and Lactate, - "Anal. Chem". v. 42, 1970, p. 118-121 (прототип).
5. L.Russell Melby. Canadian J. of Chemistry, v. 43, 1965, p. 1448.



А



Б

Редактор Н.Рогоulich Составитель О.Скородумова
Техред М. Рейвес Корректор Г.Огар

Заказ 11152/39

Тираж 531

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Филиал ИПИ "Патент", г. Ужгород, ул. Проектная, 4