

0687587 -1

BIOSENSORS
Fundamentals and Applications

EDITED BY

ANTHONY P. F. TURNER
Cranfield Institute of Technology

ISAO KARUBE
Tokyo Institute of Technology
and

GEORGE S. WILSON
University of Arizona

OXFORD NEW YORK TOKYO
OXFORD UNIVERSITY PRESS

1987

БИОСЕНСОРЫ:
ОСНОВЫ
И ПРИЛОЖЕНИЯ

Редакторы:

Э. Тёрнер, И. Карубе, Дж. Уилсон

Перевод с английского
д-ра хим. наук И. Г. Абидора



Москва «Мир» 1987

ББК 28.072
Б63
УДК 577.1

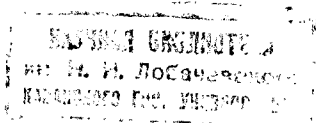
Б63 Биосенсоры: основы и приложения: Пер. с англ./Под ред.
Э. Тёрнера, И. Карубе, Дж. Уилсона. — М.: Мир, 1992. — с. ил.
ISBN 5-03-001186-2

Коллективная монография посвящена одному из важнейших достижений биоэлектрохимии — биосенсорам. «ферментным электродам». Рассмотрено также использование в биосенсорах других компонентов биологических систем: антител, клеток, тканей, целых микроорганизмов. Помимо электрических обсуждаются акустические, оптические и другие датчики. С помощью биосенсоров становится реальным непрерывный мониторинг in vivo метаболитов, ферментов, белков и лекарственных препаратов.

Для биохимиков, электрохимиков, биологов, медиков.

1911000000-120
Б 041 (01)-91 102-91

ББК 28.072



Редакция литературы по химии

ISBN 5-03-001186-2 (Русск.)
ISBN 0-19-854724-2 (Англ.)

© The various contributors listed on pp. xiii-xvi, 1987, except chapter 34
© HMSO, 1987

This book was originally published in the English language by Oxford University Press, Oxford, England

© перевод на русский язык, Абидор И. Г., 1992

Сведения об авторах

- Гл. 1 – LELAND C. CLARK, JR, Children's Hospital Research Foundation, Elland and Bethesda Avenues, Cincinnati, Ohio 45229, USA.
- Гл. 2 – ISAO KARUBE, Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama, Japan.
- Гл. 3 – MARK A. ARNOLD, Department of Chemistry, University of Iowa, Iowa City, Iowa 52242, USA.
- GARRY A. RECHNITZ, Department of Chemistry, University of Delaware, Newark, Delaware 19716, USA.
- Гл. 4 – MONIKA J. GREEN, Genetics International (UK) Inc., 11 Nuffield Way, Abingdon, Oxfordshire OX14 1RL, UK.
- Гл. 5 – JOHN M. OLD, KAY E. DAVIES, Nuffield Department of Clinical Medicine, John Radcliffe Hospital, Oxford OX3 9DU, UK.
- Гл. 6 – S.A. BARKER, Department of Chemistry, University of Birmingham, Birmingham, UK.
- Гл. 7 – P.J. WARNER, Biotechnology Centre, Cranfield Institute of Technology, Cranfield, Bedfordshire MK43 0AL, UK.
- Гл. 8 – ANTHONY E.G. CASS, Centre for Biotechnology, Imperial College of Science and Technology, London SW7 2AZ, UK.
- ENDA KENNY, Delta Biotechnology Ltd., Castle Court, 59 Castle Court, Boulevard, Nottingham NG7 1FO, UK.
- Гл. 9 – S.S. KUAN, Mycotoxin Research Center, Food and Drug Administration, 4298 Elysian Fields Avenue, New Orleans, Louisiana 70122, USA.
- G.G. GUILBAULT, Department of Chemistry, University of New Orleans, New Orleans, Louisiana 70148, USA.
- Гл. 10 – LEMUEL B. WINGARD, Department of Pharmacology, School of Medicine, University of Pittsburgh, Pittsburgh, Pennsylvania 15261, USA.
- JAMES CASTNER, Biomedical Division, E.I. du Pont de Nemours Co., Wilmington, Delaware 19898, USA.
- Гл. 11 – GEORGE S. WILSON, Department of Chemistry, University of Arizona, Tucson, Arizona 85721, USA.
- Гл. 12 – W. JOHN ALBERY, DEREK H. CRASTON, Department of Chemistry, Imperial College, London SW7 2AY, UK.
- Гл. 13 – P.N. BARTLETT, Department of Chemistry, University of Warwick, Coventry CV4 7AL, UK.
- Гл. 14 – GRAHAM DAVIS, Integrated Ionics Inc., 2235 State Route 130, Dayton, New Jersey 08810, USA.
- Гл. 15 – M.F. CARDOSI, A.P.F. TURNER, Bioelectronics Division, Biotechnology Centre, Cranfield Institute of Technology, Cranfield, Bedfordshire MK43 0AL, UK.
- Гл. 16 – W.J. ASTON, Genetics International (UK) Inc., 11 Nuffield Way, Abingdon, Oxfordshire OX14 1RL, UK.
- Гл. 17 – H. PETER BENNETTO, JONATHAN BOX, GERARD M. DELANEY, JEREMY R. MASON, SIBEL D. ROLLER, JOHN L. STIRLING, CHRISTOFER F. THURSTON, Bioelectrochemistry and Biosensors Group, King's College, University of London, Kensington Campus, Campden Hill Road, London W8 7AH, UK.
- Гл. 18 – FRIEDER W. SCHELLER, DOROTHEA PFEIFFER, FLORIAN SCHUBERT, REINHARD RENNEBERG, DIETER KIRSTEIN, Central Institute of Molecular Biology of the Academy of Sciences of the GDR, Robert-Rossle-Str. 10, 1115 Berlin, GDR.

- Гл. 19 – SVEN-OLOF ENFORS, Department of Biochemistry and Biotechnology, The Royal Institute of Chemistry, S-100 44 Stockholm, Sweden.
- Гл. 20 – DENZIL J. CLAREMONT, JOHN C. PICKUP, Division of Chemical Pathology, United Medical and Dental Schools, Guy's Hospital Campus, London SE1 9RT, UK.
- Гл. 21 – O. PROHASKA, Case Western Reserve University, Department of Biochemical Engineering, 501 Wichender Building, Cleveland, Ohio 44106, USA.
- Гл. 22 – GILBERTO D. VELHO, GERARD REACH, Unite de Recherches sur le Diabete et la Nutrition chez l'Enfant, INSERM U-290, Hopital Saint Lazare, 107 rue du Fanbourg Saint Denis, 75010 Paris, France.
- DANIEL R. THEVENOT, Laboratoire de Bioelectrochimie et d'Analyse du Milieu, U.E.R. de Sciences, U.A. 329 du C.N.R.S., Universite Paris-Val de Marne, Ave. du General de Gaulle, 94010 Creteil Cedex, France.
- Гл. 23 – MOTOAKI SHICHIRI, RYUZO KAWAMORI, YOSHIMITSU YAMASAKI, First Department of Medicine, Osaka University Medical School, 1-1-50 Fukushima-ku, Osaka 553, Japan.
- Гл. 24 – DOUGLAS B. KELL, Department of Botany and Microbiology, University College of Wales, Aberystwyth, Dyfed SY23 3DA, UK.
- Гл. 25 – ISAO KARUBE, Research Laboratory of Resources Utilization, Tokyo Institute of Technology, 4259 Nagatsuta, Midori-ku, Yokohama, Japan.
- Гл. 26 – GARY F. BLACKBURN, Fundamental Research Laboratory, GTE Laboratories Inc., 40 Sylvan Road, Waltham, MA 02254, USA.
- Гл. 27 – BENGT DANIELSSON, Pure and Applied Biochemistry, Chemical Centre, University of Lund, P.O. Box 124, S-221 00 Lund, Sweden.
- FREDRIK WINQUIST, University of Lund, Sweden.
- Гл. 28 – DAVID J. CLARKE, BARRIE C. BLAKE-COLEMAN, MICHAEL R. CALDER, Biosensor Group, Microbial Technology Laboratory, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Wiltshire SP4 0JG, UK.
- Гл. 29 – BENGT DANIELSSON, CLAUS MOSBACH, Pure and Applied Biochemistry, Chemical Centre, University of Lund, P.O. Box 124, S-221 00 Lund, Sweden.
- Гл. 30 – W. RUDOLF SEITZ, Department of Chemistry, University of New Hampshire, Durham, NH 03824, USA.
- Гл. 31 – FRANK MCCAPRA, The University of Sussex, School of Chemistry and Molecular Sciences, Falmer, Brighton BN1 9QJ, UK.
- Гл. 32 – JEROME S. SCHULTZ, Department of Chemical Engineering, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan 48109, USA.
- Гл. 33 – RANALD M. SUTHERLAND, CLAUS DAHNE, Battelle Geneva Research Centres, 7 Route de Drize, 1227 Carouge/Geneva, Switzerland.
- Гл. 34 – ROBERT J.G. CARR, DAVID J. CLARKE, Biosensor Group, Microbial Technology Laboratory, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Wiltshire SP4 0JG, UK.
- ROBERT G.W. BROWN, JOHN G. RARITY, Royal Signals and Radar Establishment, Malvern, Worcs. WR14 3PS, UK.
- Гл. 35 – DANIEL R. THEVENOT, THIERRY TALLAGRANDE, ROBERT STERNBERG, Laboratoire de Bioelectrochimie et d'Analyse du Milieu, U.E.R. de Sciences, U.A. 329 du C.N.R.S., Universite Paris-Val de Marne, Ave. du General de Gaulle, 94010 Creteil Cedex, France.
- Гл. 36 – P.D. HOME, K.G.M.M. ALBERTI, The Medical School, University of Newcastle, Newcastle upon Tyne, UK.
- Гл. 37 – JAMES MCCANN, Genetics International (UK) Inc., 11 Nuffield Way, Abingdon, Oxfordshire OX14 1RL, UK.

Предисловие

Предлагаемую вниманию читателя книгу можно рассматривать как углубленное введение в специфическую область биосенсоров, возникшую в начале 60-х годов на стыке биологии и аналитической химии. Биосенсорами называются устройства, в которых чувствительный биологический элемент тесно связан с преобразователем его реакции на специфическое внешнее воздействие (химическое или физическое) в удобный для регистрации и обработки сигнал. Отправной точкой в развитии биосенсоров стал 1962 г., когда американскому ученому Л. Кларку, работавшему в клинической лаборатории, пришла счастливая мысль объединить высокоспецифическую ферментную систему и чувствительный электрохимический датчик в единый прибор, названный им ферментным электродом. В настоящее время биосенсорная техника развивается исключительно быстро и стремительно внедряется в практику.

Данная книга является коллективной монографией, написанной ведущими специалистами в области биосенсоров и в смежных областях. Она включает 37 глав, разделенных условно на 7 частей, и охватывает практически все проблемы, возникающие при разработке, изготовлении и эксплуатации биосенсоров.

В первой части (8 глав) обсуждаются биологические компоненты и принципы построения на их основе различных биосенсорных систем. Наряду с классическим ферментным электродом описаны также сенсоры на основе органелл, целых микроорганизмов, растительных и животных тканей. Значительный интерес представляют главы, посвященные способам иммобилизации биокомпонентов в сенсорах и перспективным исследованиям, нацеленным на улучшение свойств биокомпонентов (прежде всего ферментов) методами генной и белковой инженерии.

Во второй, самой большой, части книги (19 глав) детально рассматриваются электрохимические биосенсоры. Первые две главы отведены потенциометрическим сенсорам на основе ионоселективных и редокс-электродов. Следующие 13 глав посвящены наиболее разработанным амперометрическим биосенсорам – принципам их действия, теории, методам исследования, конструированию, практической реализации и применению. Детально описаны различные глюкозные сенсоры, работающие как *in vitro*, так и *in vivo*.

Особый интерес представляют главы 24–27, в которых рассмотрены биосенсоры на основе пленок Лэнгмюра–Блоджетт на полупроводниковых подложках. Это направление только начинает развиваться, однако полученные здесь результаты позволяют надеяться, что с помощью «биотипов» будут созданы сверхминиатюрные многоцелевые сенсоры, напрямую сочетающиеся с молекулярно-электронными преобразователями информации.

Несколько выпадающая из второй части глава, посвященная принципам диэлектрической спектроскопии, тем не менее дает представление о возможности применения этого метода в биосенсорной технике.

Три последующие части книги (7 глав) посвящены биосенсорам с механо-акустическими, калориметрическими и оптическими преобразователями. Последним уделено больше внимания, поскольку во многих случаях они успешно конкурируют с аналогичными электрохимическими приборами.

В заключительных частях, включающих всего три главы, обсуждаются стыковка биосенсоров с вычислительной техникой (что необходимо для оперативной переработки информации), применение биосенсоров в медицине и их маркетинг. Последнее представляется особенно ценным, так как проблемы рынка наукоемкой продукции у нас обсуждаются редко.

Можно полагать, что книга заинтересует широкий круг специалистов – медиков, биологов, биохимиков, химиков-аналитиков, электрохимиков – всех тех, у кого имеется потребность в быстром и точном анализе биологических материалов.

июнь 1990 г.

*Ю. А. Чизмаджев
И. Г. Абидор*

Предисловие к английскому изданию

Биосенсор – это устройство, включающее биологический чувствительный элемент, тесно связанный с преобразователем либо интегрированный с ним. Обычно биосенсор предназначен для формирования цифрового электрического сигнала, пропорционального концентрации определенного химического соединения или ряда соединений. Казалось бы неестественный, этот брак двух противоположных дисциплин позволил объединить специфичность и чувствительность биологических систем с вычислительной мощностью микропроцессора. Развивающаяся биосенсорная техника пересекается с многими традиционными академическими дисциплинами и уже сейчас предлагает новые эффективные средства, которые предвещают радикальное изменение нашего подхода к химическому анализу.

Современная концепция биосенсора в значительной степени связана с идеями Лиланда Кларка-младшего и соавторов, развитыми в 1962 г. (см. главу 1). Авторы предположили, что если бы ферменты можно было иммобилизовать на электрохимических датчиках, то такие «ферментные электроды» расширили бы диапазон аналитических возможностей базового датчика. Последовавшая затем грандиозная работа с бесконечными вариациями этой темы постепенно раздвинула горизонты данной области. Ее нынешнее состояние в какой-то степени характеризуют перечисленные ниже потенциальные чувствительные элементы и преобразователи, которые можно использовать при конструировании биосенсоров:

Биологические компоненты

Целые организмы
Ткани
Клетки
Органеллы
Мембраны
Ферменты
Компоненты ферментов
Рецепторы
Антитела
Нуклеиновые кислоты
Органические молекулы

Преобразователи

Потенциметрические
Амперметрические
Кондуктометрические
Импедиметрические
Оптические
Калориметрические
Акустические
Механические
Химические («молекулярная электроника»)

В реальных сенсорах пока используют не все возможные комбинации этих элементов. Это, а также необходимость широкого кругозора, требуемого для уяснения сути концепций, заставило редакторов данной монографии включить в нее несколько глав, строго говоря, выходящих за рамки данного выше определения. В частности, чтобы подготовить почву для дальнейшего развития этой дисциплины, рассмотрено несколько методов, позволяющих проводить непосредственный мониторинг биологических систем.

Развитие биосенсоров обусловлено усилиями исследователей в нескольких направлениях. В основу описанных к настоящему времени конфигураций биосенсоров положено принципиально новое объединение хорошо известных ранее и не связанных друг с другом подходов. В будущем для удовлетворения специфических требований все большее внимание будут уделять инженерной проработке как всего прибора в целом, так и его компонентов. Будут извлечены на свет новые биохимические реакции, а известные реакции будут усовершенствованы с помощью генной инженерии и химических методов. Их будут проектировать вместе с подходящим детектором, а не привязывать к случайным результатам предыдущих работ. Весьма перспективное

направление исследований – создание новых материалов для конструирования преобразователей или более эффективной связи между компонентами сенсора. Кроме того, стремительное падение цен на элементы электронной аппаратуры, такие как лазеры, сделают вполне доступными относительно недорогие варианты сложного лабораторного оборудования. Не следует пренебрегать и конструкцией самого сенсора. Чтобы оптимизировать основные характеристики сенсора, в частности время отклика, селективность и стабильность работы, необходимо понимать, что фундаментальные свойства сенсора определяются как свойствами его компонентов, так и их сложными взаимосвязями. На эффективность конкретного сенсора глубокое влияние могут оказать техника иммобилизации и новые мембранные материалы.

Движущей силой в исследовании сенсоров было ярко выраженное инстинктивное понимание возможности их широких практических приложений. Эти исследования стимулировались прежде всего потребностями медицины. Возможность немедленного анализа клинических препаратов, очевидно, одинаково привлекает внимание и врачей, и пациентов, хотя некоторые национальные службы здравоохранения испытывают трудности с внедрением этой философии. Более привлекательной, вероятно, является возможность непрерывного *in vivo* мониторинга метаболитов, лекарственных препаратов и белков с помощью миниатюрных и портативных систем. Отличным примером клинического приложения является сенсор глюкозы для больных диабетом, ставший классическим объектом исследований в области биосенсоров. В данном случае необходимо следить за концентрацией глюкозы в крови как *in vivo*, так и *in vitro* и обеспечить возможность полного автоматического контроля за состоянием больного с помощью инсулинового насоса. Имплантируемые глюкозные сенсоры прокладывают пути для других приложений. Дополнительной серьезной проблемой здесь все же остается биологическая совместимость.

В последние годы возрастает интерес к другим возможным использованиям биосенсоров. Клинические исследования повернулись в сторону ветеринарии и животноводства. Все больше внимания придается качеству продуктов в пищевой промышленности. В этой области давно признано значение быстрых методов оценки срока хранения, порчи и загрязнения продуктов. Развитие биотехнологии стимулирует разработку методов мониторинга процессов ферментации, что также расширяет возможности непрерывного контроля этих процессов. Проблемы охраны окружающей и промышленной среды стимулировали разработку сенсоров для определения таких вредных веществ, как оксид углерода и гербициды. В то же время интересы военных неизменно сосредоточены на специальных требованиях биологической и химической защиты.

Цель этой книги состоит в том, чтобы дать читателю углубленное и исчерпывающее представление о биосенсорах. Участие в монографии большого числа авторов позволило отдать должное индивидуальным подходам, исторически сложившимся в данной области. Спорные и неустоявшиеся аспекты области изложены их главными защитниками. По возможности аргументация дана ясно и четко и доступна ученым, специализирующимся в различных дисциплинах; окончательный вывод предоставляется сделать самому читателю. Какое направление будет доминировать в следующее десятилетие, точно сказать трудно. Ясно только, что биосенсоры почти наверняка вторгнутся в жизнь ученых самых разных специальностей.

Крэнфилд,
июнь 1986 г.

Энтони П. Ф. Тёрнер

БИОЛОГИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ

Глава 1

Ферментный электрод

Лиланд С. Кларк-младший

Поскольку сама жизнь зависит от непостижимо сбалансированного специфического переноса электронов между ферментами и субстратами, вряд ли удивительно, что средства контроля жизненных биохимических клеточных процессов могут включать сенсоры, состоящие из тех же веществ, которые участвуют в этих процессах. Как и в прошлом, прогресс в этой области определяется углубленным пониманием механизмов функционирования ферментов, возможным синтезом ферментов, более точным контролем переноса электронов, тесным взаимодействием между электрохимией и физиологией живых систем.

Важнейшей вехой в развитии биохимии было открытие братьями Бухнерами процесса брожения в фильтрате дрожжевых клеток, оболочки которых были разрушены растирианием с песком. Вслед за тем в 1926 г. Самнер сумел получить кристаллическую уреазу и таким образом показал, что ферменты имеют явно белковую природу. Для этого магическая роль ферментов предположительно сводилась к их органическому вплетению в жизненный процесс. Большинство исследователей полагало, что с ферментами следует обращаться как со скоропортящимися продуктами, такими, как свежие яйца, и перед измерениями или использованием их следует хранить на холоде.

Рассматривая ферменты как специфические химические преобразователи, переводящие определяемое вещество в форму, детектируемую физическими или химическими методами, удалось придумать и разработать новый класс сенсоров, для которых характерна чувствительность к биологическим соединениям. Перспективным путем повышения селективности и чувствительности и расширения возможностей этих устройств является комбинирование различных ферментов, например эстераз, дегидрогеназ и оксидаз с детекторами — полярографическими, кондуктометрическими, потенциометрическими, акустическими и оптическими. В первых ферментных электродах ферменты физически удерживались на поверхности сенсора или в непосредственной близости от нее. Позже были предложены методы химической иммобилизации, осаждения и другие. Коферменты также физически или химически закрепляются на поверхности сенсора. Перевод фермента в нерастворимую форму как способ увеличения его времени жизни позволяют избежать осложнений, связанных с осмотическими явлениями в коллоидных растворах, особенно когда в ферментном электроде используется проницаемая для определяемого компонента мембрана. В идеальном случае ферментный биосенсор должен работать непосредственно в неразбавленной цельной крови, подобно газовым и рН-электродам, в свое время произведшим революцию в анализе.

В биомедицинских исследованиях широко используют глюкозные и лактатные электроферментные системы, особенно для быстрого анализа малых проб крови в виде пятен. Внутрисосудистые биосенсоры могут найти применение в устройствах для непрерывного контроля состава крови, используемых для интенсивной терапии в пе-

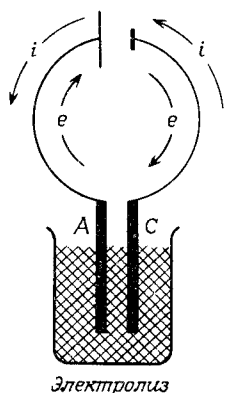


Рис. 1.1. Электролиз. На аноде (А) субстрат теряет электроны и окисляется. На катоде (С) субстрат принимает электроны (e) и восстанавливается. Приложенный потенциал до некоторой степени контролирует тип реакций. Принято считать, что ток (i) течет в противоположном направлении.

диатрии и коронарной медицине. Будущее имплантируемых сенсоров, например глюкозных электродов для контроля работы инсулиновых насосов и лактатных сенсоров для контроля водителей ритма сердца и дефибрилляторов, в значительной степени зависит от того, удастся ли найти способы стабилизации соответствующих ферментов при температуре тела в контакте с физиологическими жидкостями. Блестящие перспективы биосенсоров в биологии и медицине, по-видимому, обусловлены самой их природой. Современный уровень развития биосенсоров, по-видимому, можно сравнить со стадией эволюции человека, когда он только что перестал спускаться с деревьев в сумерках, чтобы поохотиться, и начал возделывать землю при солнечном свете. Ферменты все шире используют в промышленности, аналитических лабораториях и клинических исследованиях. В случайной выборке из десяти выпусков Analytical Electrochemistry (CA Selects) за 1985 г. из более чем 1500 рефератов около 600 касается ферментных электродов.

Полярография тесно связана с электролизом (рис. 1.1). Предшественником полярографического ферментного электрода можно считать ртутный капаящий электрод Гейровского (рис. 1.2) [17]. В годы между двумя мировыми войнами Гейровский детально исследовал электрохимическую природу поверхности ртути во взаимосвязи с приложенным потенциалом и химическими реакциями. Для проведения этой работы из растворов предварительно удаляли воздух, так как присутствие кислорода создавало заметные помехи в полярографии (так был назван новый метод) с ртутным

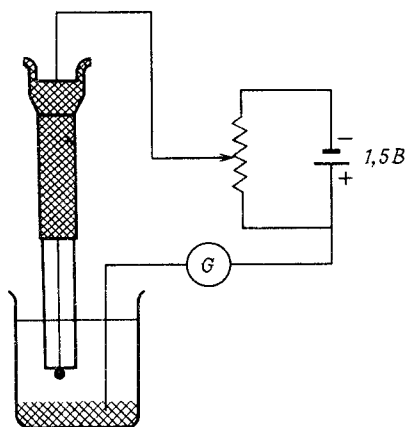


Рис. 1.2. Ртутный капаящий электрод [17]. Используется обычно в диапазоне напряжений от +0,4 до -2,6 В. С платиновыми электродами можно работать при напряжении от +0,9 до -0,8 В.

электродом. Усилия химиков постоянно направлены на расширение возможностей и повышение селективности этого электрохимического метода. С точки зрения аналитика наиболее важные достоинства ртутного капающего электрода — это его теоретическая привлекательность, воспроизводимость результатов и аналитические возможности, особенно при предварительной подготовке проб в лаборатории. На рис. 1.3 показано вполне пригодное для работы, хотя и сложное, устройство, позволяющее адаптировать ртутную полярографию к определению ферментов. Однако во многих случаях удивительные преимущества обновляющейся каждые несколько секунд поверхности ртутного электрода не могут быть использованы, поскольку жидкая ртуть токсична и неудобна в обращении. В физиологии предпочтительно проводить определение кислорода с помощью биологически инертных твердых анодов и катодов. С этой целью испытаны (и все еще испытываются) многие типы твердых электродов. Обычно выбирают платину, отчасти потому что платиновую проволоку можно впаять в стекло и таким образом изолировать. Однако необновляемая поверхность этого электрода легко загрязняется множеством веществ, содержащихся в крови и тканях. Эти проблемы рассмотрены в обзоре Дэвиса [13]. Многие из них были решены в 1953 г., когда Кларк и др. [9] предложили покрывать кислородный платиновый электрод целлофаном. Однако по настоящему новый, воспроизводимый способ измерения парциального

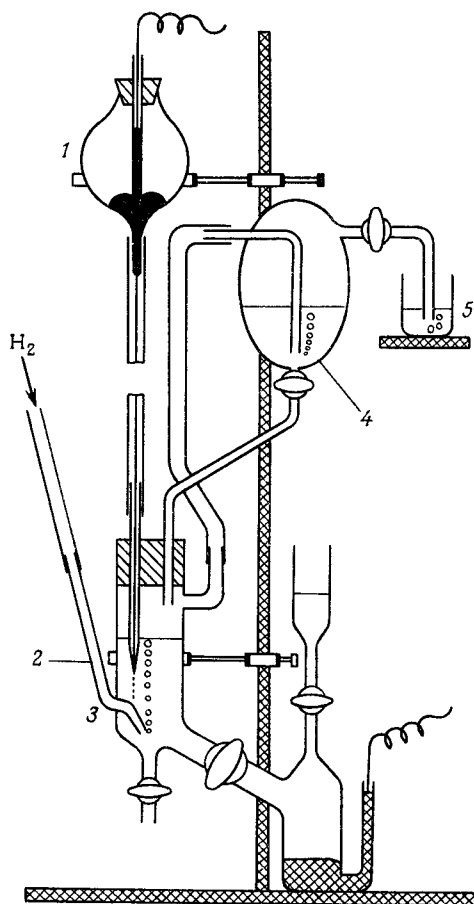


Рис. 1.3. Аппаратура для изучения действия ферментов [20].

давления кислорода в тканях, жидкостях и газах был создан только тогда, когда и платиновый электрод, и серебряный электрод сравнения поместили в заполненную электролитом микрокамеру, отделенную непроницающей полиэтиленовой мембраной, проницаемой только для газа [3]. Поскольку для биологических исследований важно именно определение кислорода, а не ионов или органических веществ, потенциал можно было поддерживать постоянным. Во многих биосенсорах для определения кислорода используют сочетание кислородного электрода Кларка и закрепленных на его мембране различных ферментов.

На катоде, как правило, происходит необратимое восстановление кислорода, а на аноде — необратимое окисление субстрата, например пероксида водорода или аскорбиновой кислоты. В отличие от оптических методов, в полярографии, как показал Гейровский, приложенный потенциал определяет химизм протекающих процессов, а сила тока характеризует их количественно. Таким образом, давление и поток электронов позволяет соответственно контролировать и измерять протекающие в системе процессы.

О биосенсорах, т. е. сенсорах, включающих биологический материал (рис. 1.4), впервые сообщалось на симпозиуме New York Academy of Sciences в 1962 г. [6]. В этом сообщении было предложено использовать ферментные преобразователи, «встроенные» в мембраны (так, что получается подобие сэндвича), чтобы сделать электрохимические сенсоры (рН, полярографические, потенциометрические или кондуктометрические) более совершенными. В результате получились сенсоры, специфически чувствительные к определенным субстратам, поскольку они детектировали образование продукта ферментативной реакции или расход одного из участвующих в этой реакции веществ. Описана, в частности, комбинация глюкозооксидазы с O_2 -электродом Кларка для определения глюкозы по убыли содержания кислорода при превращении глюкозы в глюконовую кислоту и пероксид водорода.

В принципе существует два типа полярографических сенсоров с ферментным электродом. В одном случае определяемое вещество взаимодействует с кислородом в присутствии фермента, и регистрируется изменение давления кислорода. В другом —

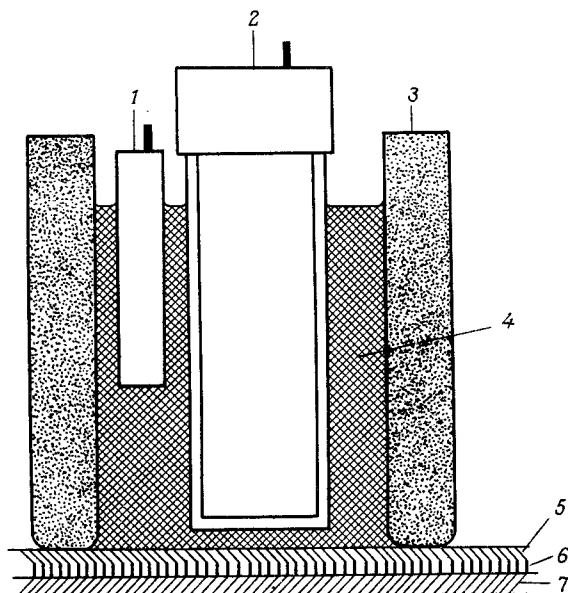


Рис. 1.4. Первый ферментный электрод [6].

фермент превращает определяемый компонент в вещество, к которому чувствителен сенсор. Назначение фермента – превращение определяемого вещества из формы, к которой сенсор нечувствителен, в форму, к которой он чувствителен. Поэтому о ферментном слое стали говорить как о преобразователе. Вещество, образуемое в ходе ферментативной реакции, следовало бы называть «трансформатом». Тогда анализируемое вещество (субстрат) превращалось бы в «трансформат» в ферментном слое в среде либо «католита», либо «анолита».

Если обратить полярность классического амперометрического кислородного электрода и превратить его в анод с положительным потенциалом около 0,6 В, то он становится совершенно нечувствителен к кислороду, но зато дает отклик на пероксид водорода, который окисляется до воды. На платиновом аноде окисляется также аскорбиновая кислота, однако лишь немногие другие вещества присутствуют в физиологических жидкостях в количествах, достаточных чтобы влиять на ток в области, соответствующей катодному току кислородного электрода. Чувствительность этого анода к пероксиду водорода казалась привлекательной, но поскольку катализа имеется почти всюду, биосенсор для определения пероксида водорода не представляет особой ценности, за исключением случаев измерения активности каталазы или пероксидазы. Поэтому считалось, что белки только загрязняют поверхность платины. Так, первое в моей практике использование платинового катода было связано с настоящей необходимостью удерживать белки и клетки крови вдали от поверхности платины. Думаю, что размышления о том, как уберечь платиновый анод от каталазы, и привели меня к идее использовать одну и ту же мембрану для того, чтобы одновременно удерживать каталазу вдали, а другие ферменты (все они представляют собой белки с большими молекулами) вблизи платины. В первом ферментном электроде фермент помещался, как начинка сэндвича, между двумя мембранами, поскольку все еще опасались загрязнения поверхности платины белками и коферментами. Но я также добавлял фермент непосредственно в электролит между анодом и катодом, и электрод хорошо работал при определении глюкозы.

К 1963 г. я занимался прежде всего использованием анодной полярографии для определения H_2O_2 , образующегося в реакции, катализируемой оксиредуктазой кислорода. При помощи пероксидного сенсора можно анализировать цельную кровь, что исключает необходимость центрифугирования и позволяет непрерывно контролировать содержание субстратов, например определять глюкозу *in vivo* или в потоке *in vitro*. При использовании кислородных электродов необходимо удалять эритроциты вместе с переносчиками кислорода – гемоглобином и использовать только сыворотку или плазму крови.

В 1965 г. или около того я определял глюкозу в разбавленной крови послеоперационных пациентов, опуская электрод в химический стакан. Тогда лактат все еще определяли по методу Баркера – Саммерсона, и я надеялся, что однажды будет найдена лактатоксидаза, генерирующая пероксид. К 1965 г. относится мой патент [4], включающий случаи использования одного или нескольких ферментов для превращения различных субстратов в конечном итоге в пероксид водорода. В нем также было описано применение двух электродов, что позволяет вычитать ток электрода без фермента из тока электрода с ферментом и тем самым исключить фоновые токи. К 1969 г. я убедил фирму Yellow Springs Instrument Company начать разработку специального анализатора для прямого определения глюкозы в пробах цельной крови объемом 25 мкл. И в 1974 г. такой анализатор (модель 23 YSI) после нескольких неудачных попыток появился на рынке.

Следует иметь в виду, что как используемый фермент, так и поляризуемый электрод сами генерируют продукты (если угодно, побочные продукты), которые не обязательно нужны и которые могут мешать протеканию основной реакции. Так, при окислении

фенола на поверхности электрода образуется блестящий черный осадок, который изменяет ее химическую активность и может даже образовать слой, не проводящий электричество. Важно также, чтобы побочные продукты не влияли на активность фермента. Лучше всего, когда продукты реакции растворимы в воде и могут диффундировать из реакционной зоны. В случае анода на основе глюкооксидазы продуктами реакции являются пероксид водорода, глюконолактон, глюконат, вода и кислород. Все они хорошо растворимы и обладают диффузионной подвижностью.

Один из способов решения проблемы полярографически активных веществ, содержащихся в анализируемом образце, заключается в конструировании мембран, которые предотвращают попадание нежелательных веществ на поверхность платины. Для этого необходимо две мембраны, одна из которых, внутренняя, исключает проникновение любого нежелательного вещества, а другая – внешняя, обеспечивает прохождение субстрата (а также обычно и мешающего вещества) в ферментный слой. Разработано множество комбинаций таких мембран и несколько из них имеется в продаже. Например, в глюкозном и лактатном электродах фирмы YSI используются комбинации ацетилцеллюлозных и поликарбонатных мембран Nuclepore.

Переход в полярографии от первых двухэлектродных систем к трехэлектродной, импульсной, дифференциальной импульсной и т. д. полярографии повысил чувствительность и точность этого метода. Важно помнить, что в различных схемах приложений к электроду потенциал влияет не только на протекающие на его поверхности электрохимические процессы, но и на состояние и активность используемого фермента. Новые пути к повышению чувствительности ферментных сенсоров открывает способ усиления сигнала путем циклического использования фермента [22].

Из множества субстратов, определяемых с помощью кислородных оксидоредуктаз, отметим глюкозу, лактат, пируват, галактозу, спирт, холестерин, глицерин, гипоксантин, ксантин, оксалат и фруктозу. Следует упомянуть остроумное использование ферроцена в качестве медиатора переноса электрона в сенсоре на основе оксидазы при определении глюкозы [2] (см. также гл. 15 и 16).

Ежегодно в примитивных формах жизни, например грибах, находят все новые кислородные оксидоредуктазы, но еще больше обнаруживается дегидрогеназ, обычно у высших растений и животных. В работе [21] предложен сенсор для определения лактата, в котором пара ферроцианид/феррицианид сопрягается с лактатдегидрогеназой.

С помощью биосенсоров можно также измерять активность большого числа ферментов в крови. Измерение активности ферментов, связанных с сердечной деятельностью (таких, как аспартатаминотрансфераза, креатинкиназа, креатинкиназа MB), позволяет оценить глубину инфаркта в клинических условиях. Наряду с определением концентрации лактата и глюкозы измерения активности этих ферментов в стационаре представляют определенную ценность при назначении терапевтического лечения больных с потенциально летальной аритмией в предгоспитальной фазе острого инфаркта миокарда. Стационарные измерения активности амилазы могут быть ценны в педиатрии.

Служба, обеспечивающая быстрое определение глюкозы, должна стать частью любого педиатрического учреждения. Проводимое круглосуточное определение глюкозы наряду с другими мерами может защитить детей от опасной гипогликемии перед хирургической операцией. Необходимо также обеспечить определение лактата и, возможно, пирувата. Врачи и младший медицинский персонал педиатрических учреждений должны быть обучены градуировке биосенсорной аппаратуры, с тем чтобы определять глюкозу и лактат в одно и то же время или в тех же образцах крови, что и газовый состав и рН.

Фэт впервые измерил парциальное давление кислорода в слизистой оболочке

глаза. Уникальный характер циркуляции жидкости в области века, позволяющий проводить непрерывный мониторинг pO_2 (а также pCO_2 и, возможно, pH), оказался ценным и для мониторинга глюкозы. Биосенсор, помещенный под веко, можно рассматривать как промежуточный между «вживляемым» и «невживляемым». Возможно, удастся непрерывно регистрировать содержание лактата в слизистой оболочке. Непрерывный контроль за содержанием глюкозы в крови может быть полезен для наблюдения за состоянием беременных женщин, больных диабетом, в процессе их трудовой деятельности и при родах.

Многообещающее будущее имеют ферментные микроэлектроды. Трудно представить себе более надежный и изящный метод определения клеточных метаболитов. Первым, кто таким способом определил содержание глюкозы внутри клетки, был Сильвер [23]. В 1984 г. австрийские исследователи [15] измерили объемные потоки и концентрацию глюкозы в изолированных перфузированных сегментах канальцев при помощи платинового электрода на основе галактозооксидазы с диаметром кончика 15–30 мкм. Электрод на основе галактозооксидазы чувствителен к раффинозе, используемой в этих исследованиях, а также галактозе, глицерину, фруктозе и дигидроксиацетону. Природа этого ферментного электрода необычным образом связана с потенциалом внутреннего раствора [19]. Существует несколько представляющих интерес способов сопряжения оксидантной активности с другими субстратами [18].

При использовании ферментных электродов в неразбавленной крови и при имплантации следует помнить, что кислородные оксидоредуктазы (оксидазы) требуют присутствия кислорода и часто скорость окисления их субстрата зависит от pO_2 . Без кислорода они не могут нормально функционировать. В работах [12, 14] электрод обеспечивался кислородом за счет генерации последнего на аноде в ферментном слое; при этом содержание определяемого вещества определяли по величине тока кислорода, необходимого для поддержания стационарного давления O_2 (рис. 1.5). Помимо биосенсоров для измерения *in situ* необходимы электроды для хирургической имплантации. Авторы [7] использовали сходный принцип оксидата, т. е. поддержания кислорода на постоянном уровне, но кислород они добавляли из насыщенного раствора с помощью сервосистемы. Недавно было показано [11], что необходимое количество кислорода можно подавать из имплантируемого силикатного мешка, что позволяет получить

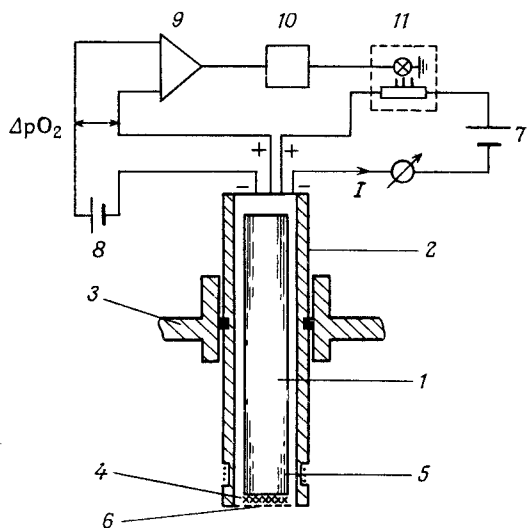


Рис. 1.5. Электрод на основе оксидазы, снабжаемый электролитическим кислородом [14]. 1 – кислородный электрод; 2 – корпус электрода; 3 – крышка ферментера; 4 – Pt сетка с иммобилизованным ферментом; 5 – Pt спираль (катод); 6 – полупроницаемая мембрана; 7 – источник напряжения, прилагаемого к электродам; 8 – источник задаваемого напряжения; 9 – дифференциальный усилитель; 10 – контроллер; 11 – регулятор тока электролиза (I).

единое устройство – сенсор, чувствительный к глюкозе, но по существу независимый от pO_2 . Способы снабжения глюкозных сенсоров кислородом описаны в работе [16].

Различные комбинации мембран на основе антител и ферментных электродов могут привести к созданию новых автоматизированных сенсоров, чувствительных к антигенам. Такие биосенсоры, возможно сопряженные с сенсорами ферментов печени, позволяют обеспечить быстрое и надежное наблюдение за кровоснабжением. На рис. 1.6 показан иммуносенсор на основе измерения потребления кислорода в присутствии глюкозооксидазы и глюкозы. Таким образом определяют содержание антигена поверхностного антигена вируса гепатита В. Описаны и другие электроферментные методы для иммунологических исследований, и это направление, видимо, будет интенсивно развиваться (гл. 14).

Ферментные электроды вполне пригодны для медицинских учреждений и для контроля в домашних условиях, поскольку их можно легко выпускать массовыми партиями из относительно недорогих и стабильных компонентов. Могут быть разработаны и недорогие приборы для определения алкоголя в крови, возможно, даже через кожу. Особенно нуждаются в биосенсорах службы срочной медицинской помощи, где срочно выполненный анализ может спасти жизнь пациента.

Но, вероятно, наибольшие перспективы имеет использование ферментных электродов как биосенсоров внутри или на поверхности живого организма. Сенсоры, например, лактата и глюкозы исключительно малого размера можно помещать во внутрисосудистые катетеры для контроля состояния тяжелобольных пациентов [5, 10]. Трудно переоценить важность такого показателя, как концентрация лактата в крови, который является мерой степени оксигенации ткани или сердечной деятельности. Имеются также данные, что высокое содержание лактата в материнском молоке во время работы матери может вредно действовать на новорожденного. Гипоксантин может оказывать ценным индикатором гипоксии. Имплантируемые сенсоры глюкозы почти наверняка можно приспособить для контроля работы инсулиновых насосов [10]. Уже одно только использование ферментных электродов при диагностировании и лечении диабета оправдывает огромные усилия по объединению энзимологии с электрохимией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boitieux J. L. et al. Clinica Chimica Acta, **136**, 19 (1984).
2. Cass A. E. G., Davis G., Francis G. D., Hill H. A. O., Aston W. J., Higgins I. J., Plotkin E. V., Scott L. D. L., Turner A. P. F. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. Anal. Chem., **56**, 667–71 (1984).
3. Clark L. C., Jr. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs, **2**, 41–8 (1956).
4. Clark L. C., Jr., Membrane polarographic electrode system and method with electrochemical compensation. U. S. Patent No. 3.539.455, 1970.

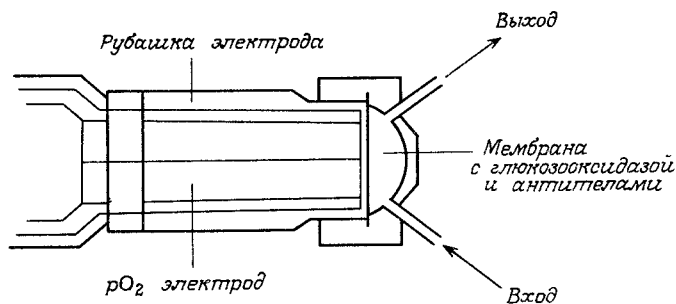


Рис. 1.6. Иммуносенсор на основе O_2 -электрода Кларка [1].

5. Clark L. C., Jr., Duggan C. A. Implanted electroenzymatic glucose sensors. *Diabetes Care*, **5**, 174-80 (1982).
6. Clark L. C., Jr., Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. NY Acad. Sci.*, **102**, 29-45 (1962).
7. Clark L. C., Jr., Sachs G. Bioelectrodes for tissue metabolism. *Ann. NY Acad. Sci.*, **148**, 133-53 (1968).
8. Clark L. C., Jr., Noyes L. K., Grooms T. A., Moore M. S. Rapid micro-measurement of lactate in whole blood. *Crit. Care Med.*, **12**, 461-4 (1984).
9. Clark L. C., Jr., Wolf R., Granger D., Taylor Z. Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J. Appl. Physiol.*, **6**, 189-93 (1953).
10. Clark L. C., Jr. Design and long-term performance of surgically implanted electroenzymatic glucose sensors. *Ann. NY Acad. Sci.*, **501**, 534-7 (1987).
11. Clark L. C., Jr., Noyes L. K., Spokane R. B., Sudan R., Miller M. L. Long term implantation of voltammetric oxidase/peroxide glucose sensors in the rat peritoneum. In *Methods in Enzymology (Immobilized Enzymes and Cells)* (ed. K. Mosbach), Vol. 137. Academic Press, San Diego, 1988.
12. Cleland N., Enfors S.-O. Control of glucose-fed batch cultivation of *E. coli* by means of an oxygen stabilized enzyme electrode. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 141-7 (1983).
13. Davies P. W. The oxygen cathode. In *Physical techniques in biological research* (ed. W. L. Nastuk), vol. 4, pp. 137-79. Academic Press, New York, 1962.
14. Enfors S.-O. Oxygen stabilized enzyme electrode. U. S. Patent No. 4374013, 1983.
15. Geibel J., Volkl H., Lang F. A microelectrode for continuous recording of volume fluxes in isolated perfused tubule segments. *Pflugers Arch.*, **400**, 388-92 (1984).
16. Gough D. A., Leypoldt J. K. Theoretical aspects of enzyme electrode design. *Appl. Biochem. and Bioeng.*, **3**, 175-206 (1981).
17. Heyrovsky J. Trends in polarography. Nobel Laureate Lecture. *Science*, **132**, 123-30 (1960).
18. Hopkin T. R. A multipurpose enzyme sensor based on alcohol oxidase. *Am. Biotechnol. Lab.*, Sept/Oct. 13 (1985).
19. Johnson J. M., Halsall H. B., Heineman W. R. Galactose oxidase enzyme electrode with internal solutions potential control. *Anal. Chem.*, **54**, 1394-9 (1982).
20. Knoblock E. *Chem. Listy*, **38**, 193 (1944).
21. Racine P., Engelhardt R., Higelin J. C., Mindt W. An instrument for the rapid determination of L-lactate in biological fluids. *Med. Instrum.*, **9**, 11-4 (1975).
22. Scheller F., Rennberg R., Schubert F. Coupled enzyme reactions. In *Intelligent sensors. Engineering Foundation VIIIth Int. Conf. on Enzyme Eng., Helsingor, Denmark, Sept. 22-27, 1985. Prog. and Abstracts*, 1985, p. 49.
23. Silver I. A. An ultra micro glucose electrode. In *Ion and enzyme electrodes in biology and medicine* (eds. M. Kessler, L. C. Clark, Jr., D. W. Lubbers, I. A. Silver, W. Simon), pp. 189-92. Urban and Schwarzenberg, Munchen, 1976.

Глава 2

Сенсоры на основе микроорганизмов

Исао Карубе

2.1. Введение

Биохимические и микробиохимические процессы все шире применяются в фармацевтической и пищевой промышленности, очистке сточных вод и энергетике. Очень важную роль в биотехнологических процессах играет брожение. Поэтому контроль сырья, клеточной популяции и конечных продуктов – необходимое условие обеспечения эффективности всей системы. Для определения органических соединений можно использовать спектрофотометрию и хроматографию, однако эти методы непригодны для непрерывных измерений в режиме «на линии» (on-line). Электрохимическое определение таких соединений имеет явные преимущества: так, можно проводить измерения без предварительной подготовки проб и, кроме того, не требуется их оптическая прозрачность. В последние годы разработано множество биосенсоров для определения органических соединений. Многие ферментные сенсоры обладают высокой специфичностью по отношению к представляющим интерес субстратам, однако используемые в них ферменты обычно дороги и неустойчивы. Микробные сенсоры состоят из иммобилизованных микроорганизмов и какого-либо электрохимического датчика и пригодны для непрерывного контроля биохимических процессов [1–3, 19, 20]. Принцип работы предложенных автором этой главы микробных сенсоров – это ассимиляция органических соединений микроорганизмами, что непосредственно регистрируется электрохимическим датчиком. В данной главе описано несколько микробных сенсоров, разрабатываемых в Японии.

2.2. Сенсор для определения усваиваемых сахаров

При культивации микроорганизмов на патоке сахарного тростника, содержащей различные сахара, для контроля процесса брожения важно определение суммарного содержания усваиваемых сахаров в среде. Так, при высокой концентрации сахара наблюдается подавление катаболизма, что приводит к подавлению роста клеток. Восстановленные сахара и сахарозу в культуральных средах можно определять феррицианидным методом [21]. Этот метод, однако, не вполне надежен, поскольку неусваиваемые сахара могут мешать определению.

Усвоение органических соединений микроорганизмами можно оценивать по дыхательной активности последних, которую в свою очередь можно непосредственно измерить при помощи кислородного электрода.

Для непрерывного определения общего содержания усваиваемых сахаров (глюкозы, фруктозы и сахарозы) в бродильной среде сконструирован микробный сенсор, состоящий из иммобилизованных живых клеток *Brevibacterium lactofermentum* и кислородного электрода [4]. *Brevibacterium lactofermentum* иммобилизовали на кусочке нейлоновой сетки (1 × 1 см, 20 меш), которую прикрепляли к кислородному электроду (рис. 2.1 и 2.2). Общее содержание усваиваемых сахаров оценивали по потреблению

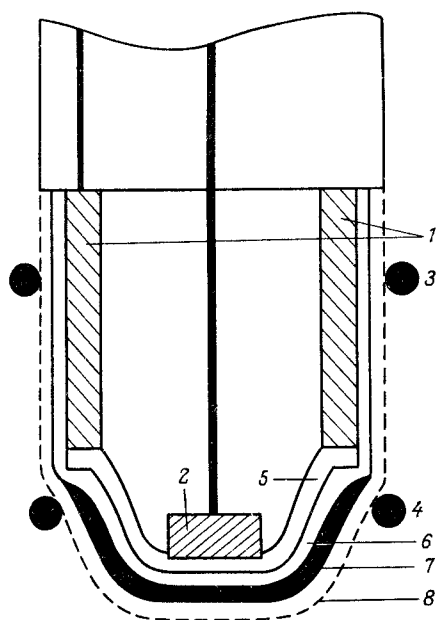


Рис. 2.1. Схема микробного электрода для определения суммарного содержания усваиваемых сахаров. 1 – серебряный анод; 2 – платиновый катод; 3, 4 – резиновые кольца; 5 – гелевый электролит; 6 – тefлоновая мембрана; 7 – микроорганизмы, закрепленные на нейлоновой сетке; 8 – целлофановая мембрана.

кислорода иммобилизованными микроорганизмами. Добавление аликвотной части глюкозы приводило к увеличению поглощения кислорода в растворе. В результате электродный ток постепенно понижался, пока не достигал некоторого стационарного значения. Время отклика сенсора составляло 10 мин при измерении стационарного тока и 1 мин в импульсном режиме. Существует линейная зависимость между уменьшением тока и концентрацией глюкозы (до 1 мМ), фруктозы (до 1 мМ) и сахарозы (до 0,8 мМ) соответственно. Чувствительность микробного сенсора к этим сахарам оценивается соотношением 1,00:0,80:0,92. При использовании растворов, содержащих 0,8 мМ глюкозы, относительное стандартное отклонение для величины уменьшения тока составляло 2%. Общее содержание усваиваемых сахаров рассчитывали, суммируя значения аналитических сигналов для откликов на глюкозу, фруктозу и сахарозу, при

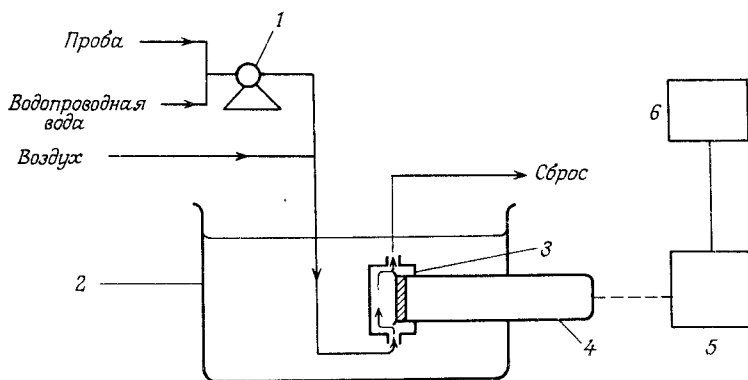


Рис. 2.2. Схематическое изображение сенсорной системы. 1 – перистальтический насос; 2 – водяная баня; 3 – проточная ячейка; 4 – микробный электрод; 5 – преобразователь; 6 – самописец.

этом разность истинных и расчетных концентраций не превышала 8%. Микробный сенсор помещали в бродильную среду для получения глутаминовой кислоты, где он надежно работал более 10 дней и выдержал 960 измерений.

2.3. Глюкозный сенсор

Для определения глюкозы предложен [4, 11] микробный сенсор, состоящий из иммобилизованных целых клеток *Pseudomonas fluorescens* и кислородного электрода (рис. 2.3). Сенсор помещали в исследуемый раствор, который во время измерений насыщали кислородом и перемешивали магнитной мешалкой.

На рис. 2.4 показана типичная зависимость сигнала сенсора от времени. Принцип работы сенсора тот же, что и в предыдущем случае. При 30°C стационарный ток устанавливался в пределах 10 мин. Точное время отклика зависело от концентрации добавленной глюкозы. При удалении микробного сенсора из раствора и помещении в среду, не содержащую глюкозы, ток постепенно возрастал и возвращался к начальному уровню примерно за 15 мин при 30°C.

Сенсор проявляет слабую чувствительность к фруктозе, галактозе, маннозе, сахарозе и не чувствителен к аминокислотам. Поэтому избирательность определения глюкозы при помощи этого микробного сенсора можно считать вполне удовлетворительной.

При измерениях стационарного тока зависимость между током и концентрацией глюкозы линейна до концентрации 20 мг/л, причем нижняя граница определяемых концентраций глюкозы составляла 2 мг/л. При содержании глюкозы 10 мг/л значение

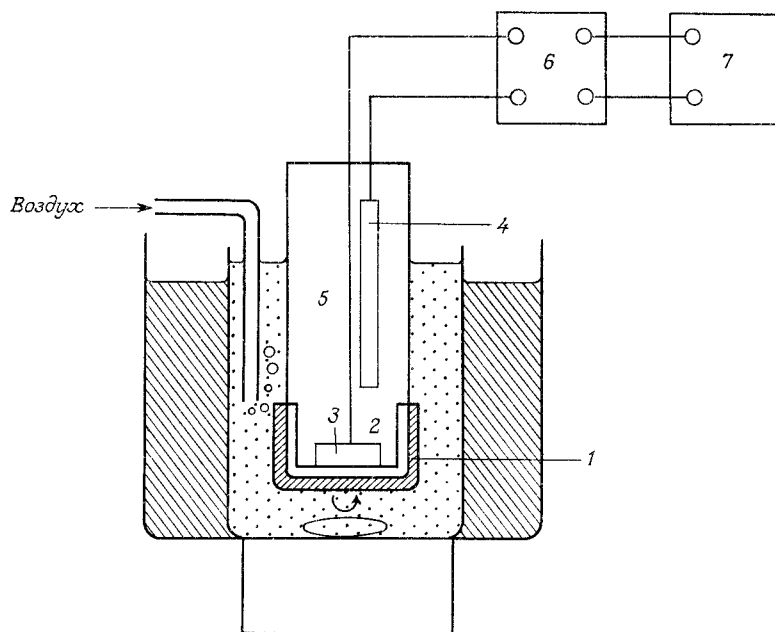
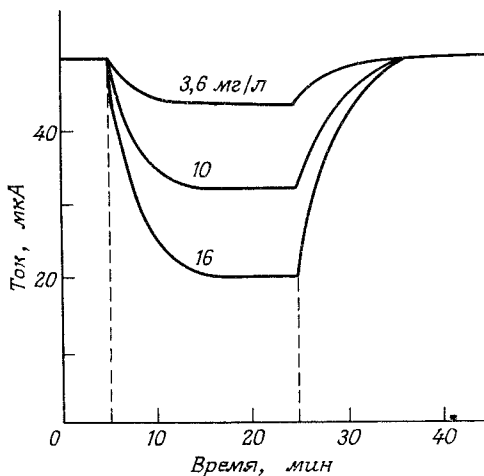


Рис. 2.3. Схема микробного электродного сенсора для определения глюкозы. 1 - бактериальная коллагеновая мембрана; 2 - тefлоновая мембрана; 3 - платиновый катод; 4 - свинцовый анод; 5 - электролит (КОН); 6 - амперметр; 7 - самописец.

Рис. 2.4. Аналитический сигнал микробного электрохимического сенсора.



тока воспроизводилось с точностью $\pm 6\%$. Стандартное отклонение составило 6,5 мг/л при числе опытов более 20.

Микробный глюкозный сенсор позволяет определять концентрацию глюкозы в потоке со средней относительной погрешностью $\pm 10\%$. Для сравнения глюкозу определяли также ферментным методом [11]; результаты коррелируют с полученными электрохимическим методом.

Изучали также возможность повторного использования микробного сенсора. Какого-либо уменьшения выходного тока не наблюдалось в течение двух недель при 150 измерениях.

2.4. Сенсор уксусной кислоты

При выращивании микроорганизмов на уксусной кислоте как источнике углерода избыток кислоты подавляет их рост и, следовательно, ее оптимальную концентрацию следует поддерживать с помощью непрерывного контроля в режиме «на линии». В работе [5] описан сенсор для непрерывного определения уксусной кислоты, состоящей из иммобилизованных дрожжей (*Trichosporon brassicae*), газопроницаемой тефлоновой мембраны и кислородного электрода.

Пористую мембрану с иммобилизованными дрожжами закрепляли на поверхности тефлоновой мембраны кислородного электрода и покрывали другой газопроницаемой тефлоновой мембраной. Таким образом, микроорганизмы помещались между двумя пористыми мембранами. Микробная сенсорная система состояла из проточной ячейки с водяной рубашкой, магнитной мешалки, перистальтического насоса, автоматического дозатора и самописца, регистрирующего ток.

Принцип работы этого сенсора аналогичен описанному выше. Поскольку ацетат-ионы не могут проходить через мембрану, pH пробы поддерживали существенно ниже рК уксусной кислоты (4,75 при 30°C). На рис. 2.5 показаны аналитические сигналы при концентрациях уксусной кислоты 18, 36, 54 и 72 мг/л.

Полученные градуировочные графики (зависимости уменьшения тока от концентрации уксусной кислоты) линейны вплоть до концентрации 72 мг/л. Нижняя граница определяемых концентраций составляет 5 мг/л. При 20 измерениях в растворе с содержанием уксусной кислоты 54 мг/л измеряемое уменьшение тока воспроизводится с точностью до $\pm 6\%$, а стандартное отклонение равно 1,6 мг/л.

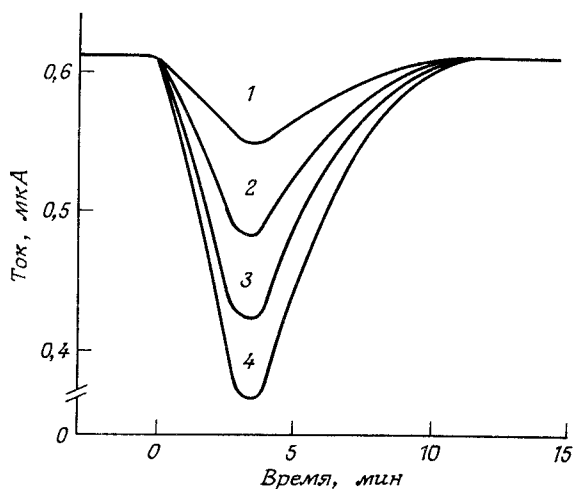


Рис. 2.5. Аналитический сигнал сенсора, чувствительного к уксусной кислоте. Анализируемый раствор (2,4 мл) пропускали через проточную ячейку в течение 3 мин. Концентрации уксусной кислоты, мг/л: 1—18; 2—36; 3—54; 4—72.

Что касается избирательности микробного сенсора по отношению к уксусной кислоте, то следует отметить, что он не чувствителен к таким летучим соединениям, как муравьиная кислота и метанол, или нелетучим компонентам питательной среды, таким, как глюкоза или фосфат-ионы. *Trichosporon brassicae* могут потреблять пропионовую, *n*-бутановую кислоты и этанол, однако при ферментации эти вещества обычно отсутствуют либо их концентрация слишком мала, чтобы мешать определению уксусной кислоты.

Для сравнения концентрацию³ уксусной кислоты в бродильной среде для производства глутаминовой кислоты определяли описанным микробным сенсором и методом газовой хроматографии. Наблюдается хорошее согласие результатов, полученных двумя методами: коэффициент корреляции равен 1,04 для 26 опытов. Выходной сигнал сенсора (0,29–0,25 мкА) был постоянен (с точностью до $\pm 10\%$ от исходного значения) более трех недель, при этом было выполнено 1500 измерений. Теперь этот микробный сенсор выпускается в Японии серийно.

2.5. Сенсор спиртов

В бродильных производствах необходимо непрерывно определять концентрации метанола и этанола в культуральных средах. При использовании спиртов в качестве источника углерода для культивируемых микроорганизмов концентрация спиртов должна поддерживаться на оптимальном уровне, чтобы избежать ингибирования субстратом. Как известно, спирты утилизируются многими микроорганизмами, следовательно, такие микроорганизмы можно использовать для конструирования спиртового сенсора [5].

Этанольный сенсор включает иммобилизованные *Trichosporon brassicae* и кислородный электрод. Способ иммобилизации клеток и конструкция электрода такие же, как в глюкозном сенсоре.

Для измерений этим сенсором в стационарных условиях требуется много времени, поэтому был использован импульсный метод, обеспечивающий отклик в течение всего 6 мин. Линейная зависимость между уменьшением тока и концентрацией этанола наблюдается в диапазоне концентраций от 2 до 22,5 мг/л. Для пробы с концентрацией этанола 16,5 мг/л разностный токовый сигнал воспроизводим с относительной

погрешностью 6%. Стандартное отклонение составило 0,5 мг/л при числе опытов, равном 40.

Сенсор не проявляет чувствительности ни к летучим соединениям, таким, как метанол, муравьиная, уксусная и пропионовая кислоты, ни к нелетучим веществам типа углеводов, аминокислот и ионов (табл. 2.1). Через покрывающую сенсор газо-

Таблица 2.1. Отклик микробного электродного сенсора с иммобилизованными *Trichosporon brassicae* на различные соединения

Состав пробы	Содержание, % *	Уменьшение тока, мкА
Этанол	$3 \cdot 10^{-3}$	0,13
Метанол	$3 \cdot 10^{-3}$	0
Уксусная кислота	0,01	0
Муравьиная кислота	0,01	0
Пропионовая кислота **	0,01	0
Глюкоза	1	0
Сахароза	1	0
KH_2PO_4	5	0

* Исходная концентрация; в проточной ячейке пробу разбавляли в 2,8 раза. ** pH > 6.

проницаемую мембрану, естественно, могут проникать только летучие соединения. Таким образом, избирательность микробного сенсора к этанолу оказалась удовлетворительной.

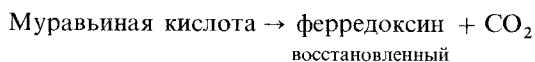
Микробный этанольный сенсор использовали в дрожжевых бродильных средах. Определение концентрации этанола в тех же пробах методом газовой хроматографии дало результаты, сравнимые с полученными при помощи микробного сенсора: коэффициент корреляции составил 0,98 при числе опытов более 20. В диапазоне концентраций этанола 5,5–22,3 мг/л выходной ток сенсора оставался постоянным более трех недель, в течение которых было проведено 2100 анализов. Сейчас этот сенсор выпускается в Японии серийно.

В метанольном сенсоре, имеющем такое же устройство, как этанольный, использовали неидентифицированные бактерии AJ3993. Уменьшение тока линейно зависит от концентрации метанола до 25 мг/л.

2.6. Сенсор муравьиной кислоты

Муравьиная кислота является обычным промежуточным продуктом клеточного метаболизма. Она найдена в культуральных средах, моче, крови, желудочных соках, будучи также продуктом многих химических реакций. Селективный спектрофотометрический ферментативный анализ с использованием формиатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы и тетрагидрофолиевокислой синтетазы непригоден для непрерывного мониторинга.

С помощью некоторых анаэробных бактерий типа *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* и *Rhodospirillum rubrum* можно получить из муравьиной кислоты водород. При этом протекают следующие суммарные реакции:



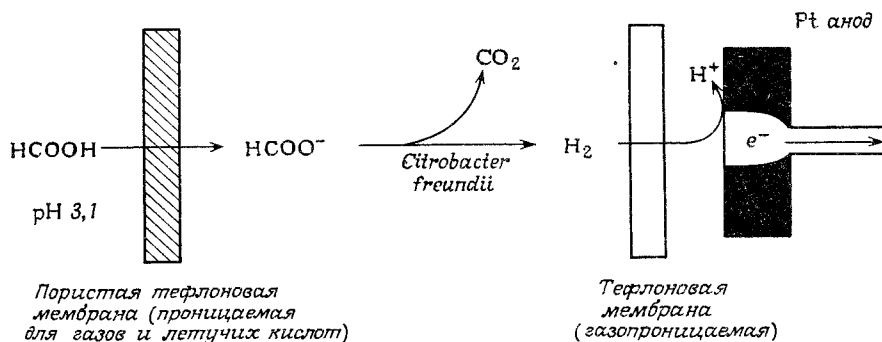
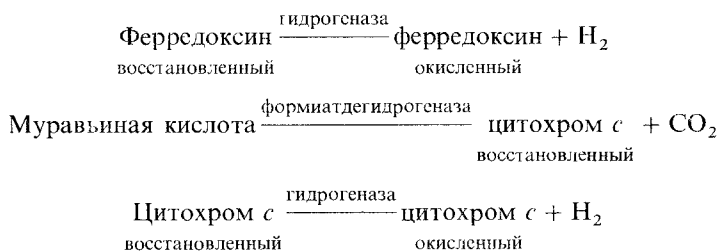


Рис. 2.6. Принцип действия микробного сенсора.



Таким образом, для определения муравьиной кислоты можно использовать, например, *C. freundii* и электрод типа используемого в топливном элементе. Принцип работы этого сенсора иллюстрирует рис. 2.6. Такой сенсор, состоящий из иммобилизованных клеток *C. freundii*, двух газопроницаемых тефлоновых мембран и электрода от топливного элемента, описан в работе [17]. Получена линейная зависимость между стационарным током и концентрацией муравьиной кислоты в диапазоне от 10 до 1000 мг/л. При содержании кислоты 200 мг/л токи воспроизводились со средней относительной погрешностью $\pm 5\%$. Стандартное отклонение составляет 3,4 мг/л при числе опытов более 30. Этот сенсор не чувствителен к нелетучим компонентам питательной среды, таким, как глюкоза, пировиноградная кислота и фосфат-ионы. Летучие соединения, такие, как уксусная, пропионовая и *n*-масляная кислоты, метанол и этанол, хотя и могут проникать через пористую тефлоновую мембрану, но не влияют на величину тока, так как *C. freundii* не могут использовать их для выработки водорода. С помощью рассмотренного микробного сенсора, а также методом газовой хроматографии определяли концентрацию муравьиной кислоты в культуральной среде *Aeromonas formicans*. Найдено хорошее согласие между этими методами – коэффициент корреляции составляет 0,98 для 10 опытов. Чтобы проверить стабильность иммобилизованных клеток *C. freundii* в сенсоре, его хранили в 0,1 М фосфатном буферном растворе при 5°C и с интервалами в пять дней использовали для определения муравьиной кислоты в одном и том же растворе с концентрацией 200 мг/л. Выходной ток оставался постоянным при всех измерениях в течение 20 дней.

2.7. Метановый сенсор

Производство метана путем сбраживания биомассы вызывает интерес во всем мире. Метан – хороший источник энергии и основной компонент природных газов, используемых как топливо. В диапазоне концентраций 5–14% метан образует с возду-

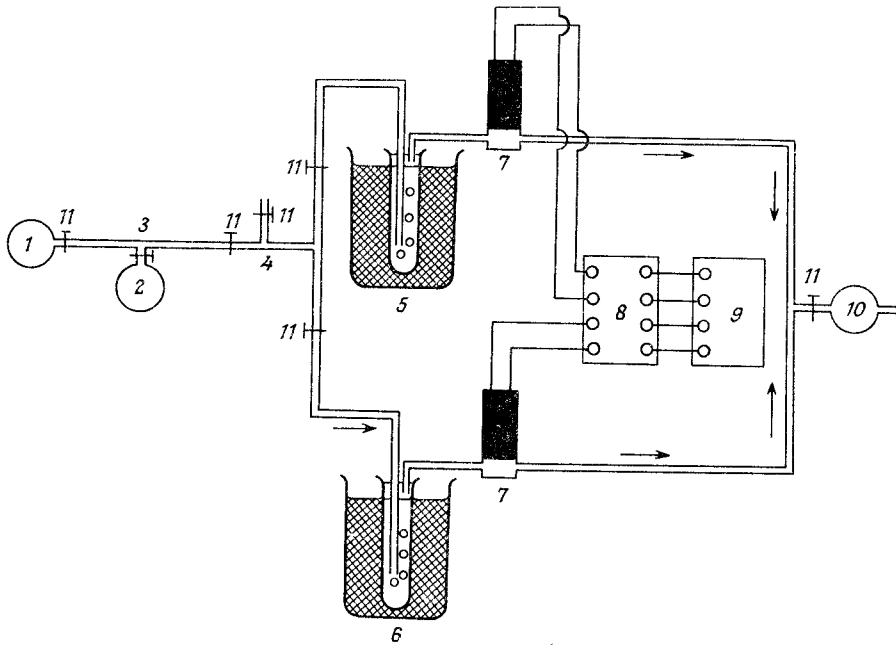


Рис. 2.7. Схема микробной сенсорной системы для определения метана. 1—вакуумный насос; 2—емкость с пробой газа; 3—линия ввода пробы газа; 4—хлопковый фильтр; 5—контрольный реактор; 6—реактор с бактериями, окисляющими метан; 7—кислородный электрод; 8—усилитель; 9—самописец; 10—вакуумный насос; 11—стеклянные краны.

хом взрывчатую смесь, поэтому необходимы быстрые методы детектирования и определения его в воздухе, например в угольных шахтах. Разработан метановый сенсор, включающий иммобилизованные бактерии, окисляющие метан, и кислородный электрод [12].

Система состоит из двух кислородных электродов, двух реакторов, электрометра и самописца (рис. 2.7). Оба реактора содержат культуральную среду, причем в одной присутствуют иммобилизованные бактерии *Methylomonas flagellata*, а в другой — нет. Электроды помещены в специально изготовленные проточные тefлоновые ячейки, соединенные с помощью стеклянных и тefлоновых трубок. Для удаления газа из соединительных трубок и транспорта газовых проб через систему использовали два вакуумных насоса, а для контроля скорости газовых потоков через реакторы (80 мл/мин) — стеклянные краны. Для удаления посторонних микроорганизмов газовые пробы пропускали через хлопковый фильтр, что предотвращало загрязнение реакторов и соединительных трубок. Фильтр устроен таким образом, чтобы потоки анализируемой пробы и вещества сравнения были симметричны.

Когда газовую пробу, содержащую метан, пропускают через реактор, иммобилизованные микроорганизмы перерабатывают метан, потребляя при этом кислород. В результате ток кислородного электрода уменьшается до некоторого минимального стационарного уровня. Поскольку в системе имеются два кислородных электрода, максимальная разность их токов зависит от концентрации метана в пробе газа. При пропускании через оба реактора чистого воздуха ток возвращается к начальному уровню в течение 60 с. Время отклика системы при определении метана меньше 60 с, а общее время анализа составляет две минуты.

Градуировочные графики рассматриваемой системы идеально линейны в диапазоне концентраций метана 0–6,6 мМ. Измеряемый разностный ток меняется в пределах 0–0,35 мкА, а нижняя граница определяемых концентраций составляет 5 мкМ. Для пробы, содержащей 0,66 ммоль метана, разностный ток воспроизводим с точностью $\pm 5\%$ (стандартное отклонение 9,40 нА) при числе опытов, равном 25.

Результаты обычного газохроматографического анализа воздуха, содержащего 0,2–0,35 ммоль метана, хорошо согласуются с результатами, полученными электрохимическим методом (коэффициент корреляции 0,97). Нижняя граница определяемых содержаний метана в случае газового хроматографа с пламенно-ионизационным детектором составляет 3 ммоль, а для микробного сенсора – 5 ммоль. Таким образом, на основе сенсора с *M. flagellata* в дальнейшем может быть разработан прибор для быстрого определения метана в режиме «на линии».

2.8. Сенсор глутаминовой кислоты

Глутаминовая кислота также образуется в процессе сбраживания и используется в качестве вкусовой добавки к пищевым продуктам. Для определения ее концентрации требуется быстрый автоматический метод. С этой целью можно использовать ферментные автоматические анализаторы, однако стоимость ферментов слишком высока. Изучение избирательности такого сенсора к различным аминокислотам показало, что он чувствителен к глутаминовой кислоте и глутамину и очень мало – к некоторым другим аминокислотам. При необходимости чувствительность сенсора к глутамину можно уменьшить, используя обработанную ацетоном *E. coli*. В анаэробных условиях микробный сенсор нечувствителен к органическим веществам, например глюкозе (7800 мг/л) и уксусной кислоте (9200 мг/л); влияние неорганических ионов на его сигнал незначительно.

При анализе проб бродильных сред с известными концентрациями глутаминовой кислоты при помощи микробного сенсора получены правильные значения (в пределах 99–103%), хорошо согласующиеся с результатами, полученными на автоанализаторах. Можно считать, что описываемый сенсор высокоизбирателен и дает стабильные и воспроизводимые результаты.

Глутаматдекарбоксилаза катализирует реакцию декарбоксилирования глутаминовой кислоты с образованием диоксида углерода и амина, однако этот фермент очень дорог и неустойчив. Однако известно, что некоторые микроорганизмы содержат глутаматдекарбоксилазу. Микробный сенсор, чувствительный к глутаминовой кислоте, включает иммобилизованные *Escherichia coli* (в качестве источника глутаматдекарбоксилазы) в сочетании с CO_2 -электродом [5]. В предварительных экспериментах было установлено, что *E. coli* не выделяет углекислый газ в анаэробной среде в отсутствие глутаминовой кислоты. Выделение бактериями в этих условиях углекислого газа может быть лишь продуктом глутаматдекарбоксилазной реакции. Для удаления растворенного кислорода из буферных растворов и проб через проточную ячейку пропускали газообразный азот. При введении в систему раствора пробы, содержащего глутаминовую кислоту, последняя проникает через мембрану к иммобилизованным микроорганизмам и включается в их метаболизм, что приводит к образованию углекислого газа. Ферментативная реакция протекает при pH 4,4, что существенно ниже значения pK_a для углекислоты (6,34 при 25°C). В результате потенциал CO_2 -электрода постепенно возрастает. Измеряя максимальные значения потенциала, анализы можно проводить через каждые 1–3 мин после впрыскивания пробы с минимальной потерей чувствительности.

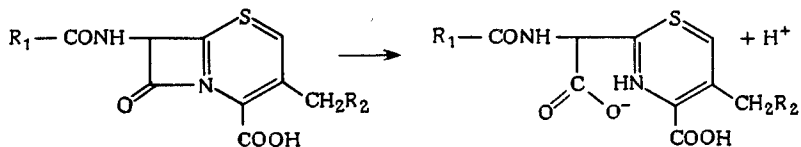
Для рассматриваемого сенсора график зависимости максимального потенциала от логарифма концентрации глутаминовой кислоты линеен в диапазоне концентраций

100–800 мг/л. Стандартное отклонение для раствора, содержащего 400 мг/л глутаминовой кислоты, составило 1,2 мг/л (20 измерений).

2.9. Цефалоспориновый сенсор

Антибиотики обычно определяют с помощью турбидиметрического или титриметрического микробиологического анализа, однако методики такого определения довольно сложны и непригодны для экспрессных анализов.

Известно, что *Citrobacter freundii* вырабатывает фермент цефалоспориназу, который катализирует реакцию цефалоспорина с выделением протона:



Цефалоспориназа, однако, очень неустойчива и не подходит для изготовления ферментного сенсора. В сенсоре, чувствительном к цефалоспоринолу, можно использовать целые клетки *Citrobacter freundii*, которые иммобилизуют в коллагеновой мембране, помещаемой затем в мембранный реактор.

На рис. 2.8 показана система для непрерывного определения цефалоспоринов. Она включает реактор мембранного типа с прокладкой в середине. Измерения pH, обусловливаемые ферментативной реакцией, измеряли комбинированным стеклянным электродом и регистрировали с помощью самописца.

При введении в реактор растворов, содержащих различные количества цефалоспоринов, разность потенциалов на электродах постепенно увеличивалась, пока не достигала некоторого максимума. Минимальное время отклика системы зависело от скорости потока и активности иммобилизованных бактерий в коллагеновой мембране.

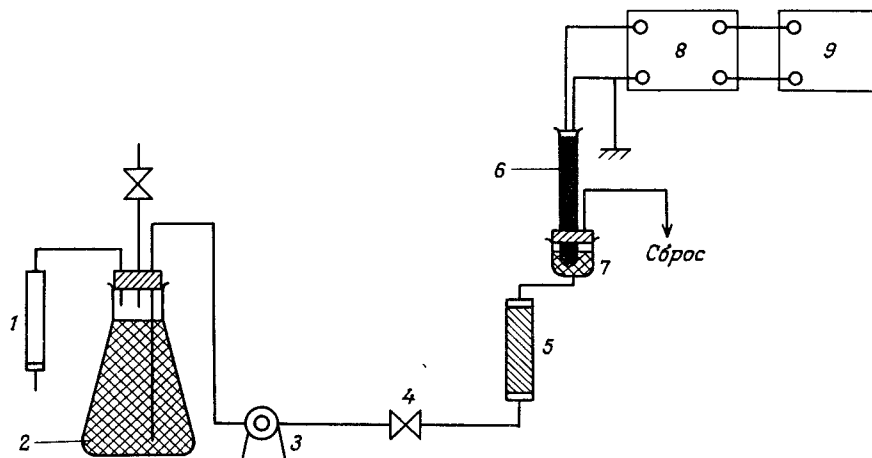


Рис. 2.8. Сенсор проточного типа на основе иммобилизованных целых клеток бактерий для определения цефалоспоринов. 1—натронная известь; 2—емкость с буферным раствором; 3—перистальтический насос; 4—ввод пробы; 5—реактор с иммобилизованными целыми клетками; 6—комбинированный стеклянный электрод; 7—измерительная камера; 8—усилитель; 9—самописец.

При скорости потока 2 мл/мин максимальная разность потенциалов достигалась через 10 мин.

Получена линейная зависимость между максимальной разностью потенциалов и логарифмом концентрации цефалоспоринов. С помощью цефалоспоринового раствора определяли 7-фенилацетиламидодезацетоксиспоровую кислоту (7-фенилацетил-ADCA), цефалоридин, цефалотин и цефалоспорин С.

Стабильность микробного сенсора проверяли, анализируя раствор, содержащий 125 мкг/мл 7-фенилацетил-ADCA. Цефалоспорин определяли несколько раз в день, однако наблюдаемая разность потенциалов не менялась в течение недели.

Эту систему применяли также для определения цефалоспоринов С в культуральной среде *Cephalosporium acremonium*. Результаты измерений сравнивали с данными, полученными методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. В случае микробного сенсора относительная погрешность составила 8%, следовательно, сенсор вполне пригоден для непрерывного определения цефалоспоринов в ферментационных средах.

2.10. Сенсор БПК

Биохимическое потребление кислорода (БПК) – один из часто используемых показателей загрязнения органическими веществами. Обычно определение БПК требует пятидневной инкубации, поэтому необходим экспрессный метод оценки БПК, дающий более воспроизводимые результаты.

В работе [13] для оценки БПК использовали бактерии *Trichosporon cutaneum*, применяемые при обработке сточных вод. Конструкция сенсора была такой же, как в рассмотренных выше примерах.

Насыщенный кислородом фосфатный буферный раствор (0,01 М, рН 7) пропускали через проточную ячейку со скоростью 1 мл/мин. Когда измеряемый ток достигал стационарного значения, в ячейку вводили пробу со скоростью 0,2 мл/мин. Значение стационарного тока зависело от БПК анализируемого раствора. Затем ток постепенно возвращался к начальному уровню. Время отклика сенсора (время, требуемое для достижения стационарного тока) зависело от природы анализируемого раствора.

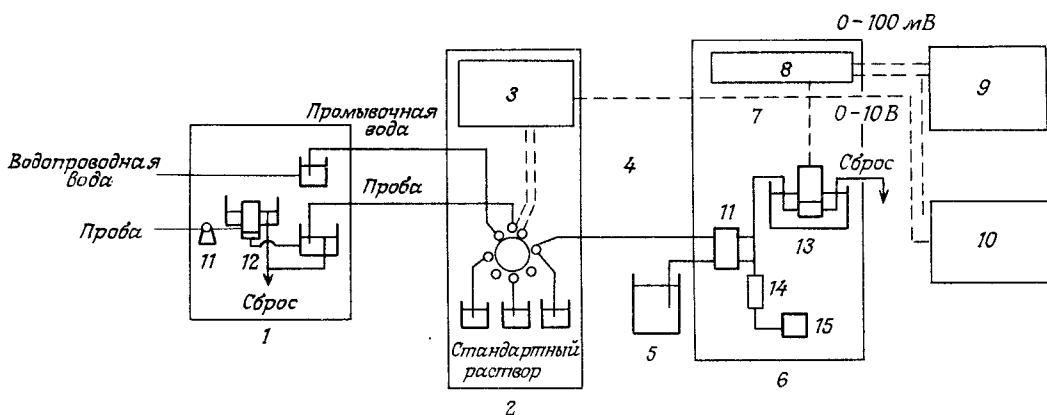


Рис. 2.9. Схема системы для непрерывного определения БПК. 1 – проботоборщик; 2 – проточный распределительный блок; 3 – пульт управления; 4 – край распределительного блока; 5 – емкость с буферным раствором; 6 – сенсорный блок; 7 – микробный сенсор; 8 – усилитель; 9 – блок регистрации; 10 – блок обработки данных; 11 – насос; 12 – фильтр; 13 – инкубатор; 14 – расходомер; 15 – воздушный насос.

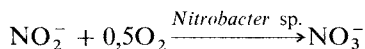
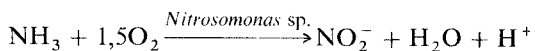
Линейная зависимость между разностью токов (начального и стационарного значений) и БПК, определяемого после пятидневной выдержки в стандартном растворе глюкозы и глутамината, наблюдалась до значения БПК 60 мг/л. Нижняя граница определяемых концентраций составляла 3 мг/л. При анализе раствора с БПК, равным 40 мг/л, ток воспроизводился с относительной погрешностью $\pm 6\%$ (число опытов более 10).

Рассматриваемый микробный сенсор применяли для оценки пятидневного БПК необработанных сточных вод бродильного производства. Пятидневное БПК сточных вод определяли также методом JIS (метод, рекомендованный *Japanese Industrial Standard Committee*). Значения БПК, оцененные микробным сенсором и определенные методом JIS, хорошо коррелировали между собой. По 17 экспериментам коэффициент корреляции составил 1,2, а отношение БПК, оцененного микробным сенсором, к БПК, определенному методом JIS, находилось в пределах от 0,85 до 1,36. Колебания отношения значений БПК, полученных двумя методами, могут быть обусловлены изменением состава воды, загрязненной органическими веществами. С помощью данного сенсора оценивали также БПК необработанных промышленных сточных вод различных типов. Найдено, что сигнал сенсора определяется соединениями, присутствующими в сточных водах. На рис. 2.9 показана БПК-сенсорная система, серийно выпускаемая в Японии.

2.11. Сенсор аммиака

Определение аммиака имеет большое значение в клиническом и промышленном анализе. Разработано несколько потенциометрических сенсоров для определения аммиака, но на их работу могут оказывать влияние ионы металлов и летучие амины. Поэтому для определения аммиака желательнее было бы разработать амперометрический сенсор.

Известно, что нитрофицирующие бактерии утилизируют аммиак в качестве единственного источника энергии. Потребление кислорода при дыхании таких бактерий описывается следующими реакциями:



Поглощение кислорода нитрофицирующими бактериями можно непосредственно определять, иммобилизуя их на кислородном электроде.

Аммиачный сенсор, описанный в работах [6, 18], состоял из иммобилизованных бактерий, газопроницаемой тефлоновой мембраны и кислородного электрода. Зависимость между уменьшением тока и концентрацией аммиака линейна вплоть до концентрации 42 мг/л. Нижняя граница определяемых концентраций составляла 0,1 мг/л. В растворе, содержащем 21 мг/л гидроксида аммония, значение уменьшения тока воспроизводилось с относительной погрешностью $\pm 4\%$; стандартное отклонение составило 0,7 мг/л для 20 опытов.

Чувствительность микробного сенсора была примерно равна чувствительности стеклянного электрода. Сенсор не реагировал на летучие соединения, такие как уксусная кислота, этанол и амины, или нелетучие питательные вещества, такие как глюкоза, аминокислоты и ионы металлов. Выходной ток сенсора был стабилен в течение более 10 дней при проведении 200 анализов.

С помощью микробного сенсора и обычным методом определяли аммиак в челове-

ческой моче. Оба метода дали хорошо согласующиеся результаты, причем микробный сенсор хорошо работал в течение длительного времени.

2.12. Другие микробные сенсоры

Автором и группой сотрудников были разработаны и различные другие микробные сенсоры [10, 14–16]. Их характеристики приведены в табл. 2.2.

Таблица 2.2. Характеристики сенсоров на основе микроорганизмов

Сенсор	Иммобилизованные микроорганизмы	Датчик	Время отклика, мин	Диапазон определяемых концентраций, мг/л
Усваиваемые сахара	<i>Brevibacterium lactofermentum</i>	O ₂ -электрод	10	10–200
Глюкоза	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	–»–	10	2–20
Уксусная кислота	<i>Trichosporon brassicae</i>	–»–	10	3–60
Этанол	То же	–»–	10	2–25
Метанол	Неидентифицированные бактерии	–»–	10	5–20
Муравьиная кислота	<i>Citrobacter freundii</i>	Топливный элемент	30	10–1000
Метан	<i>Methylomonas flagellata</i>	O ₂ -электрод	2	0–6,6 ммоль
Глутаминовая кислота	<i>Escherichia coli</i>	CO ₂ -электрод	5	8–800
Цефалоспорин	<i>Citrobacter freundii</i>	pH-электрод	10	100–500
БПК	<i>Trichosporon cutaneum</i>	O ₂ -электрод	15	3–60
Лизин	<i>Escherichia coli</i>	CO ₂ -электрод	5	10–100
Аммиак	Нитрофицирующие бактерии	O ₂ -электрод	10	0,05–1
Диоксид азота	То же	–»–	3	(0,51–255) · 10 ⁻⁴ %
Нистатин	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	–»–	1 ч	0,5–54 см ⁻³
Никотиновая кислота	<i>Lactobacillus arabinosis</i>	pH-электрод	1 ч	10 ⁻⁵ –5
Витамин В ₁	<i>Lactobacillus fermenti</i>	Топливный элемент	6 ч	10 ⁻³ –10 ⁻²
Клеточная популяция	—	То же	15	10 ⁸ –10 ⁹ клеток/см ³
Мутаген	<i>Bacillus subtilis</i> Rec ⁻	O ₂ -электрод	1 ч	1,6–2800

ЛИТЕРАТУРА

1. Aizawa M., Karube I., Suzuki S. A specific bioelectrochemical sensor for hydrogen peroxide. Anal. Chim. Acta, **69**, 431 (1974).
2. Biomedical applications of immobilized enzymes and proteins. Chang T. M. S. (ed.), Vol. 2. Plenum, New York, 1977.
3. Guilbault G. G. Handbook of enzymatic methods of analysis. Marcel Dekker, New York, 1976.
4. Hikuma M., Kubo T., Yasuda T., Karube I., Suzuki S. Amperometric determination of acetic acid with immobilized *Trichosporon brassicae*. Anal. Chim. Acta, **109**, 33 (1979).
5. Hikuma M. Microbial electrode sensor for alcohols. Biotechnol. Bioeng., **21**, 1845 (1979).
6. Hikuma M. Ammonia electrode with immobilized nitrifying bacteria. Anal. Chem., **52**, 1020 (1980).
7. Hikuma M., Obana H., Yasuda T., Karube I., Suzuki S. Amperometric determination of total

- assimilable sugars in fermentation broths with use of immobilized whole cells. *Enzyme Microb. Technol.*, **2**, 234 (1980).
8. *Hikuma M.* A potentiometric microbial sensor based on immobilized *Escherichia coli* for glutamic acid. *Anal. Chim. Acta*, **116**, 61 (1980).
 9. *Karube I.* Microbial sensor for screening mutagens. *Trends Anal. Chem.*, **3**, 40 (1984).
 10. *Karube I., Matsunaga T., Suzuki S.* Microbioassay of nystatin with a yeast electrode. *Anal. Chim. Acta*, **109**, 39 (1979).
 11. *Karube I., Mitsuda S., Suzuki S.* Glucose sensor using immobilized whole cells of *Pseudomonas fluorescens*. *Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **7**, 343 (1979).
 12. *Karube I., Okada T., Suzuki S.* A methane gas sensor based on oxidizing bacteria. *Anal. Chim. Acta*, **135**, 61 (1982).
 13. *Karube I., Mitsuda S., Matsunaga T., Suzuki S.* A rapid method for estimation of BOD by using immobilized microbial cells. *J. Ferment. Technol.*, **55**, 243 (1977).
 14. *Matsunaga T., Karube I., Suzuki S.* Rapid determination of nicotinic acid by immobilized *Lactobacillus arabinosus*. *Anal. Chim. Acta*, **99**, 233 (1978).
 15. *Matsunaga T.* Electrochemical microbioassay of vitamin B1. *Anal. Chim. Acta*, **98**, 25 (1978).
 16. *Matsunaga T.* Electrode system for the determination of microbial population. *Appl. Envir. Microb.*, **37**, 117 (1979).
 17. *Matsunaga T.* A specific microbial sensor for formic acid. *Europ. J. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 235 (1980).
 18. *Okada T., Karube I., Suzuki S.* NO₂ sensor with use immobilized nitrite oxidizing bacteria. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 1641 (1983).
 19. *Satoh I., Karube I., Suzuki S.* Continuous neutral lipid determination with lipase-collagen membrane reactor. *J. Solid-Phase Biochem.*, **2**, 1 (1977).
 20. *Satoh I.* Enzyme electrode for free cholesterol. *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1095 (1977).
 21. Technicon Industrial Systems, No. 142-71A, 1972.

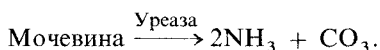
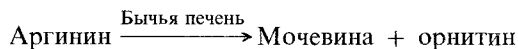
Глава 3

Биосенсоры на основе растительных и животных тканей

Марк А. Арнольд, Гарри А. Рехнитц

Тканевые материалы растительного и животного происхождения успешно используют в качестве биокаталитических компонентов биосенсоров. Биокаталитические материалы этого класса просто создают естественное окружение для представляющего интерес фермента, в результате чего требуемая ферментативная активность заметно стабилизируется. Во многих случаях тканевые биосенсоры служат намного дольше, чем аналогичные биосенсоры с выделенными ферментами. Кроме того, тканевые материалы сохраняют достаточно высокую специфическую активность, необходимую для конструирования некоторых биосенсоров, тогда как выделенные ферменты в тех же условиях разрушаются. В большинстве случаев эти преимущества достигаются не в ущерб избирательности. Если же в тканевом материале протекают мешающие процессы, разрабатывают специальные меры по увеличению избирательности. В этой главе достоинства тканевых биосенсоров показаны на конкретных примерах. Рассмотрено также несколько биосенсоров на основе таких биокаталитических материалов, как фрагменты животных клеток. Наконец, впервые предложены возможные механизмы транспорта (вход, внутренний перенос и выход) субстрата и продуктов в иммобилизованных клетках ткани.

Исторически тканевые биосенсоры появились позже рассмотренных в предыдущих главах ферментных и микробных биосенсоров [1, 6, 22, 33, 37, 38]. Возможность использования цельного фрагмента ткани млекопитающих в качестве биокаталитического слоя впервые была продемонстрирована на примере аргининового сенсора [36]. Тонкий слой бычьей печени и соответствующее количество фермента – уреазы совместно иммобилизовали на поверхности аммиачного газочувствительного датчика. На кончике сенсора протекали каталитические реакции



Разработка этого первого сенсора на основе ткани печени быка открыла путь к созданию тканевых биосенсоров.

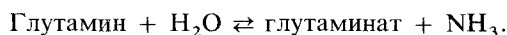
В табл. 3.1 приведены данные о тканевых биосенсорах и родственных им системах, описанных в литературе после первого аргининового электрода на основе ткани печени. В родственных системах используют субклеточные частицы, растертые в порошок высушенные ацетоном органы млекопитающих, муку из семян различных растений, целые листья и плоды. Эти биосенсорные системы детально рассмотрены в следующем разделе. При этом особое внимание уделяется усилению аналитического сигнала биокатализатора.

Таблица 3.1. Биосенсоры на основе тканей и родственных материалов

Субстрат	Биокаталитический материал	Чувствительный элемент
Глутамин	Клетки почки свиньи	NH ₃ -датчик
Аденозин	Клетки слизистой оболочки тонкого кишечника мыши	- » -
Аденозин-5'-монофосфат	Мышца кролика	- » -
	Порошок высушенной ацетоном мышцы кролика	- » -
Гуанин	Печень кролика	- » -
Пероксид водорода	Печень быка	O ₂ -датчик
Глутамат	Желтая тыква	CO ₂ -датчик
Пируват	Кукурузное зерно	- » -
Мочевина	Мука из бобов канавалии мечевидной	NH ₃ -датчик
Фосфат/фторид-ионы	Клубень картофеля/глюкозооксидаза	O ₂ -датчик
Допамин	Мякоть банана	- » -
Тирозин	Сахарная свекла	- » -
Цистеин	Лист огурца	NH ₃ -датчик
Глутамин	Митохондрии почки свиньи	- » -

3.1. Глутаминовый биосенсор

Тонкий слой клеток кортекса почки свиньи иммобилизуют на поверхности датчика, чувствительного к газообразному аммиаку. Как известно, почечные клетки отличаются высокой концентрацией фермента глутаминазы, катализирующего реакцию



Эту биокаталитическую реакцию в сочетании с аммиачным датчиком можно использовать для конструирования глутаминового сенсора.

Ткань почки свиньи иммобилизуют путем физического удерживания тканевого материала на односторонней нейлоновой сетке с размером отверстий 149 мкм. Чтобы защитить газопроницаемую мембрану аммиачного датчика от различных клеточных компонентов слоя ткани, между почечной тканью и тефлоновой мембраной помещают тонкую диэтилцеллюлозную пленку. Расположение слоев в биосенсоре показано на рис. 3.1.

При взаимодействии глутамина, поступающего из объема анализируемого раствора, с иммобилизованным биокаталитическим слоем, содержащим глутаминазу, образуется аммиак. Со временем устанавливается стационарная концентрация аммиака, поскольку образование аммиака в биокаталитическом процессе уравнивается его

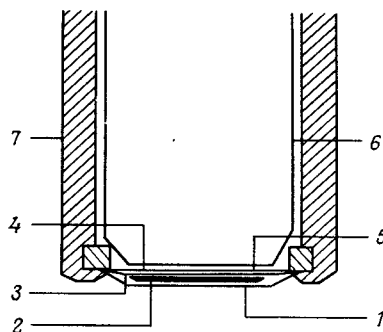


Рис. 3.1. Устройство глутаминового биосенсора. 1 – под-держивающая нейлоновая мембрана; 2 – кусочек ткани почки свиньи; 3 – внутренняя диализная мембрана; 4 – газопроницаемая тефлоновая мембрана; 5 – внутренний электрод; 6 – комбинированный стеклянный рН-электрод; 7 – корпус (4-7 – составные части газоаммиачного датчика).

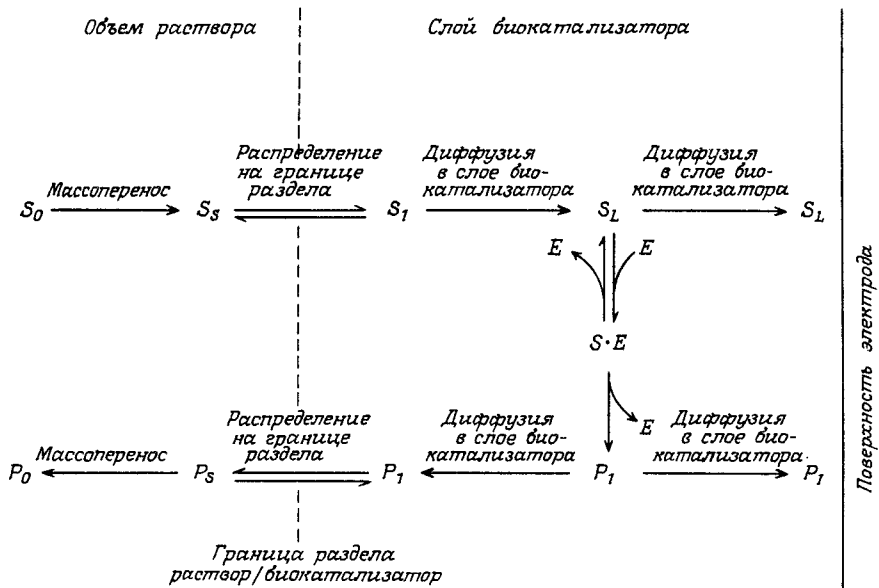


Рис. 3.2. Процессы, определяющие сигнал биосенсора.

расходом вблизи поверхности датчика. Последнее обусловлено главным образом простой диффузией аммиака обратно в объем раствора [3, 13]. На рис. 3.2 показаны различные процессы, вносящие вклад в формирование сигнала сенсора. Поскольку аммиачный датчик является потенциометрическим устройством, сигнал сенсора связан с объемной концентрацией глутамина логарифмической зависимостью.

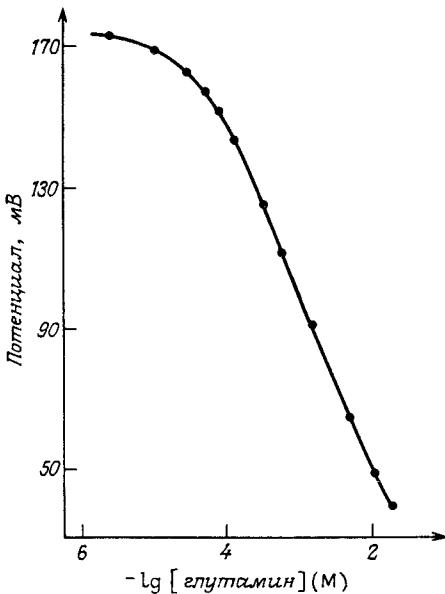


Рис. 3.3. Градуировочный график для определения глутамина с помощью биосенсора на основе ткани почки свиньи.

На рис. 3.3 представлен типичный градуировочный график определения глутамина. В области от приблизительно 0,1 до 10 мМ график линейен и имеет наклон 50 мВ/рС. Предел обнаружения, определяемый в соответствии с рекомендациями ИЮПАК [25], составляет 0,01 мМ. В фосфатном буферном растворе (0,1 М; рН 7,8) время отклика в диапазоне линейности градуировочного графика составляет от 5 до 7 мин. Как и ожидалось для сенсора этого типа, время отклика больше при низких концентрациях [13, 28].

Из-за множества биокаталитических процессов, протекающих в клетках, избирательности действия сенсоров на основе цельных клеток ткани следует уделять особое внимание. Изучение избирательности биосенсора на основе ткани почки свиньи показало его пригодность для определения глутамина в сложных биологических объектах. Специально изучалось влияние большого числа соединений (мочевина, L-аланин, L-аргинин, L-гистидин, L-валин, L-серин, L-глутаминат, L-аспарагин, L-аспартат, D-аланин, D-аспартат, глицин и креатинин), которые могли бы создавать помехи работе сенсора, но оказалось, что они не дают заметного сигнала. Как известно, в клетках почки свиньи велика концентрация D-аминокислотной оксидазы [16], поэтому проверяли также отклик сенсора на различные D-аминокислоты. В присутствии кислорода и воды этот фермент катализирует окислительное деаминирование нескольких D-аминокислот. Однако в специфических условиях работы глутаминовый биосенсор не обнаруживал чувствительности к проверяемым D-аминокислотам. То, что побочные биокаталитические процессы не влияют на сигнал биосенсора, по всей вероятности, обусловлено отсутствием флавинадениндинуклеотида в буферной системе [23].

Для поддержания столь высокой селективности в систему необходимо ввести какой-либо антимикробный агент, чтобы предотвратить загрязнение тканевого слоя бактериями. В противном случае рост бактерий на тканевом материале приводит к протеканию на поверхности датчика нежелательных биокаталитических реакций, которые могут совершенно изменить ряд избирательности сенсора. В качестве такого предохраняющего вещества в глутаминовый сенсор добавляли 0,02% азида натрия.

О селективности тканевого глутаминового сенсора можно судить также по результатам количественного анализа контрольных образцов спинномозговой жидкости (СМЖ) [7]. После пропускания проб СМЖ через катионообменник для удаления фонового аммиака, который может влиять на сигнал биосенсора, концентрацию глутамина можно измерять с хорошей правильностью и воспроизводимостью во всем клинически важном диапазоне. При этих измерениях в рабочий буферный раствор следует вводить иодацетамид для подавления мешающей реакции с участием глюкозы. По-видимому, в результате гликолиза в почечных клетках из глюкозы образуется кислота, которая влияет на потенциал рН-чувствительного аммиачного датчика. Иодацетамид известен как ингибитор гликолиза и, как было найдено, эффективно подавляет чувствительность глутаминового биосенсора к глюкозе. Определение глутамина в СМЖ можно проводить в диапазоне концентраций $2,2 \cdot 10^{-5} - 1,29 \cdot 10^{-3}$ М со средним относительным стандартным отклонением 5,6%. Такой сенсор может быть полезен, например, при изучении синдрома Рея, где высокий уровень глутамина рассматривается как диагностический критерий.

Интересной особенностью тканевого глутаминового биосенсора является то, что его срок службы существенно выше, чем у биосенсора с выделенным ферментом. В случае чисто ферментной системы глутаминазу иммобилизуют на поверхности аммиачного датчика с помощью тонкой ацетилцеллюлозной мембраны. Найдено, что после сборки градуировочные кривые ферментного сенсора достаточно быстро ухудшаются. На рис. 3.4 показано несколько градуировочных кривых для сенсора с выделенной глутаминазой в качестве биокаталитического компонента. Видно, что за считанные дни

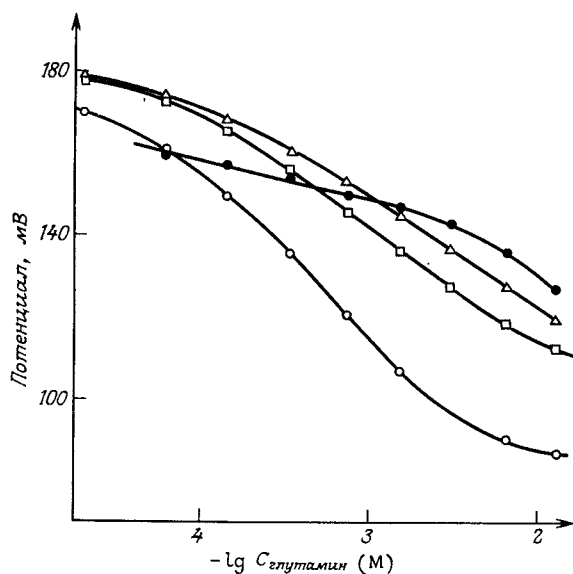


Рис. 3.4. Градуировочные кривые отклика глутаминового ферментного биосенсора. ○ — 1-й день; □ — 2-й; △ — 3-й; ● — 4-й день.

сенсор становится непригодным из-за значительной потери активности фермента. С другой стороны, тканевый глутаминовый сенсор оказалось возможным использовать до 28 дней практически без изменений его стационарного и динамического сигнала [39]. Столь большое увеличение срока службы сенсора объясняется стабилизацией активности фермента в тканевом носителе, поскольку в этом случае фермент находится в той оптимальной среде, которую сама природа подобрала именно для его функционирования. При определении срока службы в промежутках между измерениями биосенсоры хранили просто в рабочем буферном растворе при комнатной температуре. Таким образом, для хранения тканевого биосенсора не требуется каких-либо особых условий и оборудования.

Глутаминовый биосенсор уникален в том смысле, что при его создании было опробовано и изучено несколько типов биокаталитических материалов. В поисках возможных биокатализаторов исследовали выделенную глутаминазу, митохондрии клеток почки свиньи (см. ниже), кусочки ткани почки свиньи, а также интактные бактериальные клетки штамма *Sacrina flava* [8]. Эти материалы непосредственно сравнивали друг с другом, чтобы выявить относительные достоинства каждого из них.

В табл. 3.2 и 3.3 обобщены наиболее важные характеристики глутаминовых сенсоров на основе разных биокаталитических материалов. Все приведенные в этих таблицах данные получены в оптимальных для каждого сенсора условиях. Из табл. 3.2 видно, что относительные чувствительности, области линейности градуировочных графиков, пределы обнаружения и времена отклика у всех сенсоров сходны, хотя ферментный сенсор показывает плохую воспроизводимость. Следовательно, исходя только из аналитических характеристик, нельзя обоснованно выбрать какой-либо тип биокатализатора и предпочесть его другим. Необходимо принимать во внимание срок службы сенсора. Сенсор с чистым ферментом служит слишком мало, чтобы использовать его на практике. Митохондриальный, бактериальный и тканевый сенсоры значительно более долговечны, поскольку в них фермент находится в естественном окружении.

После сравнения условий работы и подготовки бактериального и тканевого сенсоров становится очевидным, что тканевый сенсор наилучшим образом подходит

Таблица 3.2. Аналитические характеристики глутаминовых биосенсоров

Биокаталитический материал	Наклон, мВ/рС	Предел обнаружения, $n \cdot 10^{-5}$, М	Диапазон линейности, мМ	Время отклика, мин	Срок службы, дни
Фермент	33–41	6,0	0,15–3,3	4–5	1
Митохондрии	53	2,2	0,11–5,5	6–7	10 *
Бактерии	49	5,6	0,1–10	5	20 *
Ткань	50	2,0	0,064–5,2	5–7	30 *

* Минимальное значение

Таблица 3.3. Требования к условиям работы и подготовки глутаминовых биосенсоров

Тип электрода	Рабочая среда	Требования к подготовке
Ферментный	0,1 М фосфатный буферный раствор, рН 7,8; 0,02% NaN_3	Суспензию фермента помещают между диализными мембранами; хранить в буферном растворе при комнатной температуре
Тканевый	То же	Вырезанный слой ткани закрепляют нейлоновой сеткой; хранить в рабочем буферном растворе при комнатной температуре
Митохондриальный	Сложная буферная система с рН 8,5; 0,12 М KCl ; 20 мМ Tris-HCl ; 40 мМ $\text{Tris-N}_3\text{PO}_4$; 5 мМ сукцината; 1 г/1,5 мл ротенона; 0,02% NaN_3	Суспензию фракции выделенных митохондрий помещают между диализными мембранами; хранить в рабочем буферном растворе
Бактериальный	0,1 М Tris-HCl ; 0,01 М MnCl_2 ; рН 7,5	Культуру бактерий фильтруют в стерильных условиях; промытую суспензию клеток помещают между диализными мембранами

для определения глутамин. Чтобы гарантировать аналитические свойства бактериального сенсора, необходимо собирать его в стерильных условиях и следить за чистотой используемой клеточной линии. В случае митохондриального биосенсора необходимо выделять митохондрии и поддерживать их в работоспособном состоянии. Хотя по сравнению с очисткой фермента выделение митохондрий является относительно легкой процедурой, оно все же значительно сложнее, чем получение тонкого слоя ткани почки свиньи. Бактериальный же сенсор можно предпочесть в тех случаях, когда нельзя использовать фосфатный буферный раствор.

Таким образом, сравнительное изучение различных биосенсоров позволяет заключить, что для определения глутамин наилучшим биокаталитическим материалом является тонкий слой ткани почки свиньи. Этот вывод, однако, нельзя распространить и на другие типы биосенсорных систем. Действительно, прежде чем делать какие-либо общие утверждения, касающиеся биокаталитических материалов, необходимо тщательное сравнительное исследование, подобное рассмотренному в данном разделе.

3.2. Аденозиновый биосенсор

Хотя глутаминовый биосенсор на основе тонкого слоя ткани почки свиньи проявляет высокую избирательность к глутамину по сравнению с другими биомолекулами,

следует осознать, что лишь в редких случаях тканевые биосенсоры могут быть высокоселективным к какому-либо субстрату, поскольку большинство тканевых материалов содержит множество ферментов и в них протекают разнообразные метаболические процессы. Примером может служить биосенсор аденозина на основе клеток слизистой оболочки тонкой кишки мыши, иммобилизованных на поверхности датчика, чувствительного к газообразному аммиаку. Этот сенсор обладает значительной электродной функцией к аденозиновым нуклеотидам. Для таких тканевых систем разработана методология повышения селективности, включающая экспериментальное выявление мешающего процесса и селективное подавление активности его ключевого фермента.

В аденозиновых электродах суспензию клеток слизистой оболочки тонкой кишки мыши помещают на поверхность газоаммиачного датчика. Клетки иммобилизуют путем включения их в гелевый слой из смеси бычьего сывороточного альбумина (БСА) и глутарового альдегида, нанесенный на газопроницаемую мембрану аммиачного датчика [9]. Для формирования отклика используют фермент аденозиндеаминазу.

На рис. 3.5 показана электродная функция рассматриваемого тканевого биосенсора к аденозину, аденозинмонофосфату (АМР), аденозиндифосфату (АДР) и аденозинтрифосфату (АТР) в рабочем буферном растворе (рН 8,2), содержащем 0,2 М Трис·НСl и 0,02% азиды натрия. Как видно, аденозиновые нуклеотиды дают значительный сигнал, который может создавать существенные помехи при определении аденозина. Для улучшения избирательности сенсора желательно создать оптимальные условия для деаминации аденозина и подавить деаминацию нуклеотидов. Выбор наиболее эффективного метода подавления зависит от того, с каким метаболическим процессом связана мешающая реакция деаминации.

Исходя из сообщений о наличии АМР-деаминазы [17] и щелочной фосфатазы [14] в клетках слизистой оболочки тонкого кишечника мыши, можно предложить три

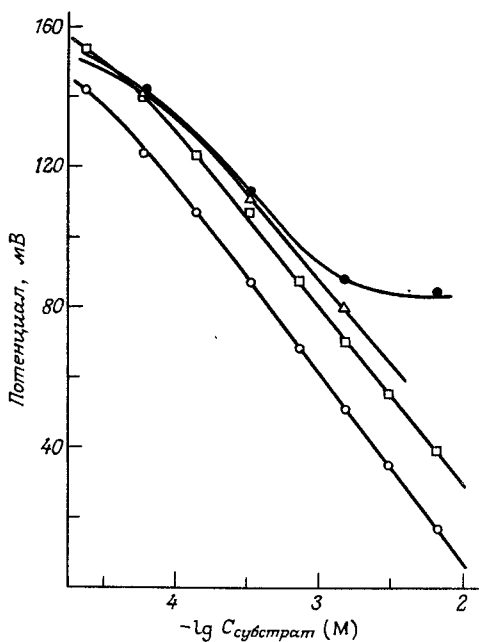


Рис. 3.5. Начальный сигнал биосенсора на основе ткани слизистой оболочки тонкого кишечника мыши. ○ — аденозин; □ — АМР; △ — АДР; ● — АТР.

возможные схемы деаминарования нуклеотидов.

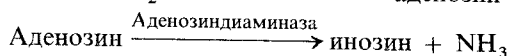
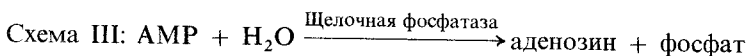
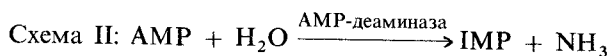
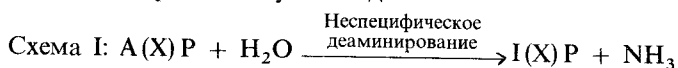


Схема I описывает случай, когда в системе имеется неспецифический фермент, катализирующий деаминирование всех трех нуклеотидов, — AMP, ADP и ATP. В схеме II каждому из этих субстратов соответствует свой специфический деаминирующий фермент. Наконец, схема III объединяет реакции, катализируемые щелочной фосфатазой и аденозиндеаминазой: первый фермент превращает аденозинсодержащие нуклеотиды в аденозин, который затем деаминируется вторым ферментом, что и создает помехи определению.

Анализируя действие различных активаторов и ингибиторов на мешающую ферментативную реакцию, можно попытаться выяснить, описывает ли какая-либо из приведенных выше схем эту реакцию, и какая именно. Согласно литературным данным, фосфат-ионы ингибируют ферментативную активность как щелочной фосфатазы [19], так и AMP-деаминазы [40]. Известно также, что глицерофосфат ингибирует AMP-деаминазу [41], но не щелочную фосфатазу [31]. В последнем случае субстратная специфичность такова, что при высоких концентрациях глицерофосфата действие щелочной фосфатазы на AMP пренебрежимо мало. Рис. 3.6 иллюстрирует влияние фосфата и глицерофосфата на деаминирование AMP и аденозина в тканевом аденозиновом электроде. Видно, что при высоких концентрациях оба ингибитора резко

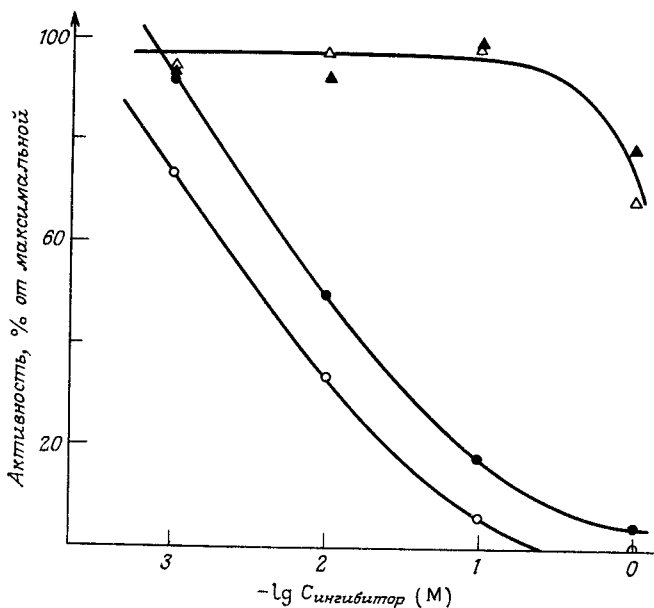


Рис. 3.6. Влияние глицерофосфата (●, ▲) и фосфата (○, △) на деаминирование. ○, ● — AMP; ∇, ▲ — аденозин.

подавляют деаминирование АМР, но очень слабо влияют на деаминирование аденозина.

Как известно [47], активность АМР-деминазы зависит от присутствия ионов калия. Исследование влияния калия на деаминирование АМР в клетках слизистой оболочки тонкого кишечника мыши, мешающее работе аденозинового биосенсора, показало, что в данном случае такая зависимость отсутствует. С другой стороны, щелочная фосфатаза тонкой кишки стереоспецифично ингибируется L-фенилаланином [20, 21]. Ингибирующее влияние L-фенилаланина на функцию электрода к АМР отчетливо проявляется при концентрации L-фенилаланина 0,1 М. Фактически в этих условиях тканевый электрод вообще не проявляет чувствительности к АМР.

Для рассматриваемых ферментов оптимальные значения рН составляют приблизительно 6,5 (АМР-деминаза) [14] и от 7,0 до 9,0 (щелочная фосфатаза) [27]. Оптимальное значение рН для деаминирования АМР в клетках слизистой оболочки тонкого кишечника мыши составляет 8,2, т.е. находится в оптимальном диапазоне щелочной фосфатазы. Диапазон рН от 9,0 до 9,4 является оптимальным для ферментативного деаминирования аденозина.

Известно, что мышечные ткани отличаются высокой активностью АМР-деминазы [14], а для клеток слизистой оболочки тонкого кишечника млекопитающих характерен высокий уровень активности щелочной фосфатазы [27]. Опубликованные ранее данные по соотношению активностей этих ферментов в клетках разных типов и представленные выше данные, в том числе о ингибирующем действии глицерофосфата, фосфата и L-фенилаланина, отсутствии активации ионами калия и оптимальных рН для побочных процессов, свидетельствуют о том, что в данном случае нежелательный процесс обусловлен сопряжением щелочной фосфатазы и аденозиндеминазы в биокаталитическом слое, образуемом клетками слизистой оболочки.

Исходя из приведенных выше результатов, можно заключить, что при рН 9,0 буферная система, содержащая фосфат-ионы, должна эффективно подавлять мешаю-

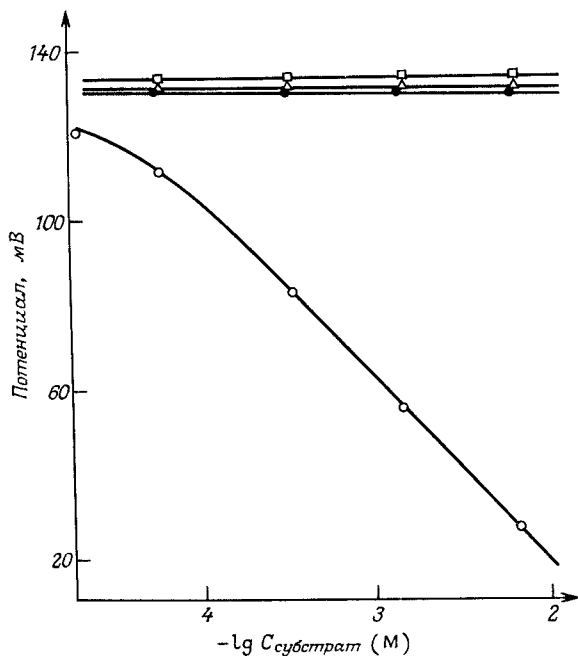


Рис. 3.7. Аналитический сигнал биосенсора на основе ткани слизистой оболочки тонкого кишечника мыши. ○ — аденозин; □ — АМР; △ — АДР; ● — АТР.

шие ферментативные процессы в тканевом аденозиновом электроде и в то же время стимулировать желаемую биокаталитическую реакцию. Рис. 3.7 показывает, как изменяется избирательность электрода к аденозину в буферном растворе, содержащем 0,1 М Трис·HCl, 0,2 М K_2HPO_4 и 0,02% NaN_3 (pH 9,0). В этих условиях электрод не обладает электродной функцией к АМР, АДФ и АТФ. Проверяли и другие соединения, которые в принципе могли бы оказывать мешающее влияние: 3'-АМР, сАМР, аденин, гуанозин и гуанин. Они также практически не влияют на сигнал тканевого электрода.

Таким образом, хотя селективность по отношению к аденозину не является специфическим свойством тканевого аденозинового биосенсора, ее можно существенно улучшить, выявив метаболические процессы, обуславливающие мешающую ферментативную активность, и подавив ее подходящим ингибитором. Этот способ применим и при разработке других мембранных тканевых электродов.

3.3. Биосенсор АМР

Тканевые материалы не только удлиняют срок службы биосенсора, но и обеспечивают большую концентрацию заданного биокатализатора. Примером может служить рассматриваемый в этом разделе биосенсор АМР с газоаммиачным датчиком. Ограниченная площадь поверхности датчика не позволяет иммобилизовать большие количества ферментного препарата. Поэтому если специфическая активность последнего невысока, то и аналитические характеристики сенсора будут неудовлетворительными. Эффект низкой концентрации фермента проявился, в частности, в случае ферментного АМР-электрода, описанного в работе [35]. Используемый в этом сенсоре выделенный фермент обычно имеет низкую активность, что приводит к малой величине наклона градуировочных кривых и короткому сроку службы. Чувствительность и срок службы сенсора АМР можно значительно улучшить при помощи тонкого слоя мышечной ткани кролика. Повышение чувствительности биосенсора непосредственно связано с пятикратным увеличением активности биокатализатора на поверхности датчика.

И в ферментном, и в тканевом АМР-биосенсорах используют протекающую на поверхности газоаммиачного датчика каталитическую реакцию

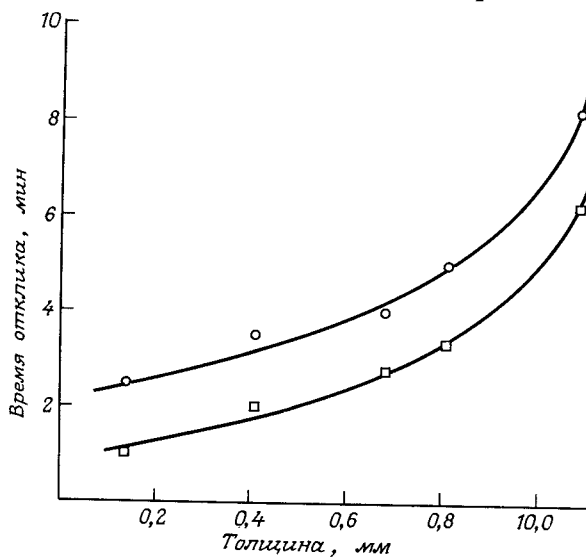
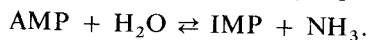


Рис. 3.8. Влияние толщины ткани на время отклика биосенсора АМР. Концентрацию субстрата меняли в пределах от 0,14 до 0,34 мМ (○) и от 3,0 до 6,6 мМ (□).

Выделенный фермент иммобилизуют на поверхности датчика с помощью диацетилцеллюлозной мембраны. В тканевом биосенсоре тонкий слой мышечной ткани кролика удерживают на датчике нейлоновой сеткой с отверстиями размером 37 мкм. Сенсоры обоих типов хранят при комнатной температуре в рабочем буферном растворе, содержащем 0,1 М Трис·HCl, 0,1 М KCl и 0,02% азида натрия (pH 7,5). После сборки тканевый биосенсор следует выдерживать от 2 до 4 ч для удаления фонового аммиака.

Чтобы улучшить аналитический сигнал тканевого АМР-сенсора, оптимизировали различные параметры эксперимента (pH, концентрацию ионов калия, температуру и толщину слоя ткани). Найденные оптимальные условия – pH 7,5, 0,1 М K^+ и 25°C. На рис. 3.8 представлены результаты изучения влияния толщины ткани на время отклика биосенсора. Увеличение толщины ткани приводит к большим временам отклика, которые становятся неприемлемыми при толщине слоя больше 0,81 мм. С другой стороны, кусочки ткани толщиной меньше 0,5 мм неудобны в обращении и плохо воспроизводимы. По этим причинам для изготовления сенсора используют слой ткани толщиной от 0,5 до 0,8 мм, которые можно легко получить с помощью острого лезвия бритвы.

Слой мышечной ткани кролика толщиной 0,5 мм содержит приблизительно пять международных единиц АМР-деаминазной активности [10]. В то же время сравнимый объем (25 мкм) коммерческого препарата фермента имеет активность всего 0,1 ед. Такая низкая активность и приводит к плохой чувствительности ферментных биосенсоров. Фактически перед иммобилизацией выделенный фермент приходится концентрировать фильтрацией в течение 16 ч и в результате активность ферментного слоя на поверхности электрода повышается до 0,9 ед. [35]. Но даже после такого концентрирования ферментативная активность в слое ткани остается выше примерно в пять раз. В табл. 3.4 приведены основные характеристики сенсоров АМР на основе различных биокаталитических материалов. Наилучшие эксплуатационные характеристики, в том числе наклон 58 мВ/рС и срок службы не менее 28 дней, достигаются при использовании кусочка ткани, который обладает наибольшей ферментативной активностью из всех приведенных материалов. Напротив, система на основе фермента характеризуется наклоном, составляющим только 46 мВ/рС и всего лишь четырехдневным сроком службы. Таким образом, если выделенные ферменты имеют недостаточную специфическую активность, то более эффективны слой ткани.

Часто бывает трудно найти надежный источник приобретения некоторых видов млекопитающих для получения специфического тканевого материала. В таких случаях в качестве биокатализатора удобнее использовать порошок из высушенной ацетоном ткани. Первая попытка такого рода описана в сообщении о биосенсоре АМР, в котором пасту из растертой в порошок обезвоженной ацетоном мышцы кролика физически закрепляли на поверхности аммиачного датчика [4].

Пасту из растертой в порошок мышцы кролика получают следующим образом. В пластиковую пробирку (1 мл) вводят 300 мкл буферного раствора, содержащего 0,1 М Трис·HCl, 0,1 М KCl и 0,02% азида натрия (pH 7,9), и добавляют 100 мг замороженного порошка. Смесь перемешивают на вихревой мешалке в течение 30 с. При такой обработке получается однородная паста, необходимое количество которой (обычно 10 мг) наносят на тефлоновую мембрану аммиачного датчика. Поверх пасты помещают диацетилцеллюлозную мембрану и заворачивают колпачок электрода до положения, при котором паста прочно удерживается на месте. Собранный биосенсор оставляют вымачиваться на ночь в указанном выше буферном растворе для удаления фонового аммиака из биокаталитического слоя.

Характеристики биосенсора АМР на основе порошка из обработанной ацетоном мышцы кролика также приведены в табл. 3.4. Видно, что по основным характеристикам данная система весьма близка к тканевому биосенсору. Оба биосенсора превосхо-

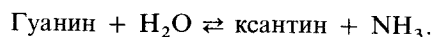
Таблица 3.4. Сравнение характеристик биосенсоров АМР

Характеристика	Фермент	Кусочек ткани	Высушенный ацетоном порошок
Наклон, мВ/рС	46	58	57
Диапазон линейности ($n \cdot 10^{-4}$), М	0,8–150	1,4–100	3,3–130
Предел обнаружения ($n \cdot 10^{-5}$), М	6,0	4,8	4,0
Время отклика, мин	2–6	2,5–8,5	2,5–8,0
Срок службы, дни	4	28	25

дят ферментный как по величине наклона градуировочной кривой, так и по сроку службы. Поскольку тканевый порошок обычно доступнее и дешевле, по-видимому, его и следует использовать в большинстве случаев как биокатализатор для определения АМР.

3.4. Гуаниновый биосенсор

По мере появления новых типов биочувствительных датчиков становится все более очевидной необходимость разработки эффективного подхода к оптимизации тканевых биокатализаторов. Один из подходов был предложен в работе [11]. В нем особое внимание уделяется происходящим в биосенсоре биохимическим процессам и мембранным фазам. Иллюстрацией его практического применения может служить оптимизация гуанинового биосенсора, конструкция которого включает фрагмент ткани печени кролика и газоаммиачный сенсор. Основной биокаталитический процесс описывается уравнением



Гуаниновый биосенсор собирают следующим образом. Слой печени кролика толщиной 0,5 мм помещают между двумя целлюлозными диализными мембранами. Эту трехслойную систему помещают на газопроницаемую мембрану аммиачного датчика и собирают сенсор, как обычно. Свежеприготовленные сенсоры оставляют вымачиваться на ночь в 0,2 М боратном буферном растворе (рН 8,0), содержащем 0,02% азида натрия. В промежутках между измерениями гуаниновые сенсоры хранят в этом же растворе при комнатной температуре.

Оптимизация характеристик тканевого биосенсора должна включать и экспериментальное изучение различных параметров сенсора. Как правило, необходимо детально рассмотреть методику иммобилизации тканевого слоя, влияние рН, активаторов и ингибиторов, срок службы и общую избирательность биосенсора. Существует несколько методов иммобилизации тканевого слоя, основанных либо на физическом его удерживании подходящей мембраной, либо на захвате химически сшитым белковым носителем. Многие тканевые материалы достаточно прочны и могут быть относительно легко иммобилизованы при помощи нейлоновой сетки. В случае же гуанинового биосенсора ткань печени кролика прижимают к поверхности электрода мембраной из диацетилцеллюлозы, поскольку эта ткань не обладает достаточной механической целостностью, позволяющей использовать крупноячеистую нейлоновую сетку.

Для нормального функционирования тканевых биосенсоров важно учитывать влияние рН и концентрации как активаторов, так и ингибиторов. От рН раствора зависит как биокаталитическая активность ферментов, так и потенциал газочувствительного мембранного электрода. Для усиления желательных и подавления мешающих ферментативных реакций в систему часто вводят соответствующие активаторы и

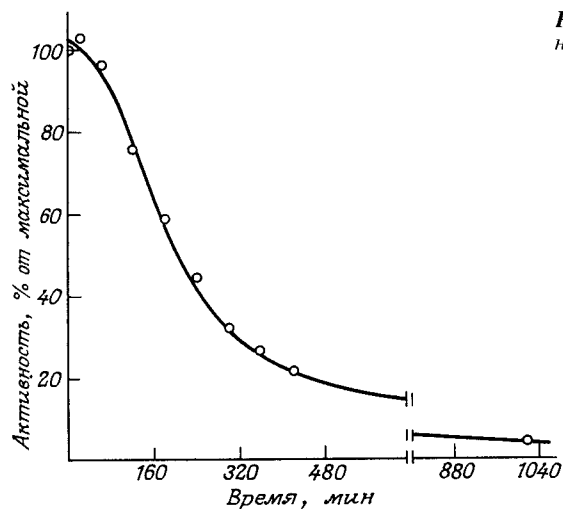


Рис. 3.9. Спад активности гуаназы со временем при pH 9,5.

ингибиторы. Обычный метод изучения их эффекта заключается в измерении начальной скорости ферментативной реакции, когда скорость образования продуктов непосредственно связана с эффективной биокаталитической активностью фермента [24]. Несмотря на то что метод может дать только относительную информацию, он быстр и удобен для сравнения различных растворов. Следует только иметь в виду, особенно при изучении влияния pH, что начальная скорость изменения сигнала биочувствительного датчика определяется как каталитическим, так и чувствительным компонентом. Поэтому такие измерения позволяют одновременно оптимизировать систему по каждому из этих параметров. В случае гуанинового сенсора скорость образования аммиака максимальна при pH 9,5. Однако если принять во внимание стабильность биокатализатора и срок службы электрода, то значение pH 8,0 оказывается более практичным, хотя при этом достигается всего лишь 50% максимальной биокаталитической активности.

Срок службы биосенсоров часто ограничивается стабильностью биокаталитического компонента [2]. Для продления срока службы биосенсоров приходится вводить стабилизирующие агенты и оптимизировать условия хранения. Важность подбора соответствующих условий хранения хорошо видна на примере гуанинового сенсора, в котором использована ткань печени кролика. Оптимальные значения pH для активности и стабильности биокатализатора в этом сенсоре не совпадают. На рис. 3.9 показано изменение во времени активности гуаназы при pH 9,5, что соответствует оптимуму для каталитической реакции. Быстрое падение активности фермента ясно показывает, что биосенсор, хранимый при этом pH, будет служить недолго. При pH 9,0 и 8,5 получены аналогичные результаты. Сенсор стабилен лишь при хранении его в растворе с pH 8,0.

Помимо стабильности иммобилизованного тканевого материала, необходимо учитывать также срок сохранности самого органа, из которого изготавливают различные биосенсоры. В табл. 3.5 приведены условия и минимальные сроки хранения некоторых тканевых материалов. Как видно, многие тканевые материалы можно хранить очень долго, а стоимость их обычно невелика. Поэтому они являются экономически наиболее выгодными биокатализаторами для многих биочувствительных датчиков.

Конечно, в любой схеме оптимизации биосенсоров на основе ткани уделяется особое внимание их селективности, поскольку в тканевых материалах обычно проте-

Таблица 3.5. Условия хранения отдельных органов

Субстрат	Биокаталитический материал	Условия хранения	Срок хранения *, мес
Глутамин	Почка свиньи	-25°C	6
АМР	Мышца кролика	-25°C	7
Гуанин	Печень кролика	-25°C	7
Аденозин	Тонкая кишка мыши	-25°C, 100%-ный глицерин	2
Глутаминат	Желтая тыква	+4°C	1
Пируват	Кукурузное зерно	+4°C	2

* Минимальные значения.

кает множество метаболических процессов. Как правило, помехи возникают в результате ферментативных реакций, в которых непосредственно определяемый электрохимическим датчиком продукт образуется из каких-либо субстратов, кроме основного, и реакций субстратов, вызывающих изменение рН на поверхности электрода. Побочные процессы первого типа являются более общими, и их труднее устранить. Способ борьбы с ними, предложенный в работе [9], предполагает выяснение того, какие именно ферменты ответственны за побочные реакции, и подавление их активности специфическими ингибиторами. При этом следует убедиться, что введение ингибитора не оказывает неблагоприятного влияния на основную биокаталитическую реакцию. Помехи второго типа, т.е. изменение рН у поверхности электрода, лучше всего минимизировать, применяя рабочий раствор с высокой буферной емкостью.

Селективность гуанинового биосенсора на основе ткани печени мыши оказалась превосходной в присутствии 1 мМ магния (II) (для ингибирования аденозиндеаминазы) и в отсутствие фосфат-ионов (для активации гуанозинфосфоорилазы) [11]. Такой сенсор не проявляет чувствительность к инозину, аденину, СМР, ИМР, креатинину, креатину, аспарагину, серину, мочеvine, глутамину, глутаминату, орнитину, треонину, лизину, валину, глицину и аргинину при миллимолярных концентрациях этих соединений.

В настоящее время тонкая регулировка биохимического процесса и тщательный подбор мембранных материалов, толщины слоя ткани и методики иммобилизации являются неотъемлемыми элементами процедуры оптимизации тканевых биосенсоров.

3.5. Биосенсор пероксида водорода

До сих пор все представляющие интерес для изготовления биосенсоров ткани использовались в сочетании с потенциометрическим аммиачным мембранным электродом. В работе [32] был впервые описан амперометрический тканевый биосенсор, в котором слой ткани печени быка иммобилизовали на датчике, чувствительном к кислороду, и определяли пероксид водорода. Печень быка содержит значительное количество фермента каталазы, который катализирует реакцию $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$. Образование кислорода контролируется амперометрически.

Для изготовления тканевого сенсора пероксида водорода используют срез печени толщиной 0,1 мм быка, который удерживают на кислородном электроде нейлоновой сеткой. Найдено, что для данного биосенсора пригодна печень и других животных. Измерения проводят в 0,05 М фосфатном буферном растворе (рН 6,8), содержащем

0,2% азида натрия и предварительно продутом азотом. После сборки биосенсор необходимо выдержать в буферном растворе в течение 2 ч.

Градуировочные кривые биосенсора на основе ткани бычьей печени линейны до концентрации пероксида водорода 10 мкМ. Концентрационный диапазон линейности охватывает примерно один порядок величины, а времена отклика и возврата сигнала к начальному значению сравнительно невелики и не превышают 2 мин при небольших концентрациях. Этот сенсор проявляет ярко выраженную селективность к пероксиду водорода и практически нечувствителен к высоким концентрациям таких потенциально мешающих веществ, как глюкоза, спирт, L-аминокислоты и лактат.

По сравнению с аналогичным сенсором на основе чистого фермента рассматриваемый тканевый сенсор менее чувствителен к изменениям рН и температуры. Более того, система на основе ткани имеет значительно больший срок службы, возможно, благодаря стабилизирующему действию тканевой матрицы.

3.6. Биосенсор глутамината

Первый описанный в литературе тканевый биосенсор на основе тонкого слоя растительного материала предназначен для определения глутамината [29]. Тонкий слой мякоти желтой тыквы иммобилизируют на поверхности датчика, чувствительного к газообразному диоксиду углерода. Глутаминатдекарбоксилаза, присутствующая в больших концентрациях в желтой тыкве, катализирует реакцию



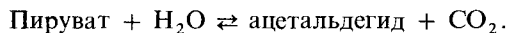
Срез мякоти тыквы иммобилизовали в матрице из БСА и глутарового альдегида, используя 0,002%-ный диацетат хлоргексидина как консервант.

Оптимальный отклик глутаминатного биосенсора на основе ткани желтой тыквы наблюдается в 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 5,5), содержащем 40% глицерина и 0,3 мМ пиридоксаль-5-фосфата. В этих условиях в диапазоне концентраций глутамината от $4,4 \cdot 10^{-4}$ до $4,7 \cdot 10^{-3}$ М зависимость сигнала сенсора от концентрации глутамината близка к нернстовской (наклон 48 мВ/рС), а предел обнаружения составляет 0,2 мМ. Время отклика сенсора обычно не превышает 10 мин, а его активность сохраняется в течение 7 дней. Особенно важно то, что этот сенсор обладает очень высокой селективностью и не проявляет чувствительности ко многим другим биологически значимым соединениям [29].

В целом тканевый глутаминатный сенсор по своим характеристикам превосходит аналогичную ферментную систему, что свидетельствует о возможности использования растительных материалов в качестве биокаталитического компонента.

3.7. Пируватный биосенсор

Как и у некоторых биосенсоров на основе тканей млекопитающих, срок службы пируватного биосенсора на основе растительной ткани выше, чем у соответствующей системы с выделенным ферментом [30]. При этом увеличение срока службы сенсора достигается без потери его селективности, что объясняется стабилизацией биокатализатора в растительной ткани. Кукурузные зерна, как известно, отличаются высоким содержанием фермента пируватдекарбоксилазы, катализирующего реакцию



Устройство, включающее этот биокатализатор в сочетании с датчиком, чувствительным к диоксиду углерода, позволяет определять пируват. В пируватном сенсоре тонкий срез кукурузного зерна физически закрепляют на поверхности электрода с помощью

обычной диализной мембраны или путем захвата его носителем из БСА и глутарового альдегида. Подобные способы иммобилизации используют при изготовлении пируватных сенсоров с выделенным ферментом.

Аналитические характеристики пируватных сенсоров на основе ткани кукурузного зерна и выделенного фермента приведены в табл. 3.6. Использование кукурузного зерна в качестве биокатализатора улучшает такие параметры сенсора, как наклон и диапазон линейности градуировочной кривой, а также предел обнаружения. С другой стороны, ферментная система имеет меньшее время отклика. Для уменьшения времени отклика тканевого электрода была предпринята попытка фракционировать зерна, с тем чтобы иммобилизовать только их активные компоненты. К сожалению, эта попытка оказалась неудачной, поскольку фермент равномерно распределен по большей части зерна.

Как видно из табл. 3.6, срок службы электрода на основе кукурузного зерна

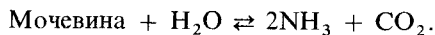
Таблица 3.6. Аналитические характеристики пируватных биосенсоров

	Фермент	Кукурузное зерно
Наклон, мВ/рС	35	47
Предел обнаружения, М	$1,6 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \cdot 10^{-5}$
Диапазон линейности, мМ	0,74–4,3	0,25–3,0
Время отклика, мин	4–10	10–25
Срок службы, дни	1	7

значительно выше, чем в случае выделенного фермента. Фактически за три дня наклон градуировочной кривой ферментной системы непрерывно падает с 35 до 12 мВ/рС, тогда как у тканевой системы минимальные изменения наблюдаются лишь через семь дней. Такое продление срока службы достигается без ухудшения избирательности – тканевая система практически нечувствительна к самым разнообразным соединениям, которые в принципе могли бы влиять на сигнал сенсора [30].

3.8. Биосенсор мочевины

В работе [5] описан биосенсор для определения мочевины, а котором в качестве биокаталитического компонента используют слой муки из бобов канавалии мечевидной. Эта мука исходно содержит большое количество фермента уреазы, который катализирует реакцию



Этот биокаталитический материал оказался удачным заменителем чистого фермента.

Рассматриваемый биосенсор готовят следующим образом. С целого боба канавалии мечевидной удаляют наружный слой и измельчают семя с помощью ступки и пестика. Свежеприготовленную муку (обычно 7 мг) наносят на поверхность газоаммиачного датчика и смешивают с небольшим объемом буферного раствора (0,2 М Трис·НСl, рН 8,5, 0,1 мМ ЭДТА). Полученную таким способом пасту равномерно размазывают по мембране датчика и добавляют глутаровый альдегид, чтобы связать белки. В результате получается стабильный биокаталитический слой. Градуировочные кривые обычно получают в буферном растворе, содержащем Трис·НСl и ЭДТА при 25°C. Биосенсоры хранят в том же растворе при комнатной температуре.

Как видно из табл. 3.7, основные характеристики мочевинового сенсора на основе бобовой муки лучше, чем у сенсора на основе выделенного фермента. Более того,

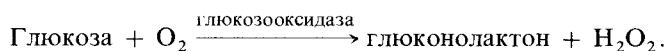
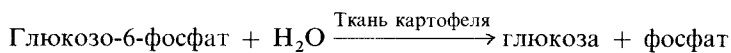
Таблица 3.7. Сравнение параметров биосенсоров на основе муки из бобов канавалии мечевидной и уреазы

	Бобовая мука	Уреаза
Наклон, мВ/рС	58	55
Диапазон линейности, $n \cdot 10^{-5}$, М	3,4–150	3,0–500
Предел обнаружения, $n \cdot 10^{-6}$, М	2,1	1,0
Время отклика, мин	1–5	1–5
Срок службы, дни	94	60

найденно, что как катализатор бобовая мука проявляет ярко выраженную селективность по отношению к мочеvine в присутствии разнообразных веществ, которые потенциально могли бы мешать определению. Преимуществами бобовой муки по сравнению с ферментом являются также низкая стоимость и более удобные условия хранения. Очищенная уреаза относительно дорога и должна храниться при температуре замораживания или более низкой, тогда как бобовая мука существенно дешевле и неплохо сохраняется при комнатной температуре. Таким образом, при конструировании биосенсоров мочеvine мука из бобов канавалии мечевидной является хорошей заменой очищенной уреазы.

3.9. Фосфат-фторидный сенсор

Для количественного определения фосфатов и/или фторидов разработан смешанный биосенсор на основе тонкого среза картофельного клубня и раствора глюкозооксидазы. В данной системе ткань картофеля является источником кислой фосфатазы, которая катализирует реакции на поверхности кислородного датчика биосенсора:



Стационарный ток датчика определяется заданной концентрацией глюкозо-6-фосфата во внешнем растворе. Фосфат- и фторид-ионы известны как ингибиторы кислой фосфатазы [42]. Следовательно, добавление любого из этих анионов будет замедлять скорость образования глюкозы, что можно оценить по уменьшению расхода кислорода. Как правило, в системе с самого начала устанавливается стационарный ток, соответствующий определенной скорости расхода кислорода. Затем в нее вводят исследуемый или стандартный раствор, содержащий фосфат- или фторид-ионы, и определяют увеличение тока, регистрируя первую производную зависимости тока от времени.

Поскольку фосфат-ионы являются конкурентными ингибиторами кислотной фосфатазы, наблюдается линейное соотношение между концентрацией фосфат-ионов и величиной, обратной максимальной скорости изменения тока в диапазоне концентраций фосфатов от 25 мкМ до 1,5 мМ. С другой стороны, градуировочные кривые для фторид-ионов нелинейны, что связано со сложной природой неконкурентного ингибирования кислой фосфатазы этими ионами. Тем не менее в диапазоне концентраций фторид-ионов от 0,2 до 6 мМ можно получить приемлемую градуировочную кривую. Продолжительность определения обоих анионов составляет около 5 мин. Если в

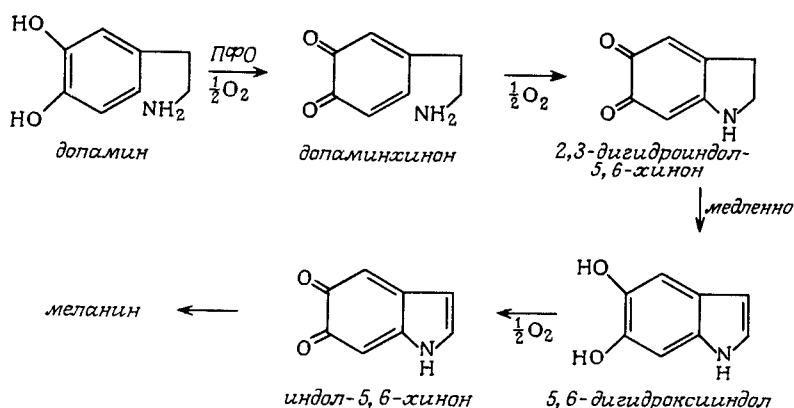


Рис. 3.10. Схема каталитического окисления допамина (ПФО – полифенолоксидаза).

промежутках между измерениями хранить сенсор при 4°C, он остается активным по меньшей мере 24 дня.

Как и можно было ожидать для сенсора, в котором используется эффект ингибирования ферментативной реакции, недостатком смешанного сенсора на основе картофельной ткани является мешающее влияние различных ингибиторов кислой фосфатазы. Из них следует упомянуть такие соединения, как нитраты, бораты, молибдаты и органические фосфаты. Глюкоза и глюкозо-6-фосфат также могут создавать помехи, поскольку в их присутствии может меняться скорость выделения кислорода. Однако при соответствующей подготовке проб концентрацию как фосфат-, так и фторид-ионов можно определить довольно точно.

3.10. Допаминовый биосенсор

В предложенном в работе [44] тканевом биосенсоре, селективном к допамину, тонкий слой мякоти банана физически иммобилизуют на поверхности амперометрического кислородного электрода. Реакции, протекающие на электродной поверхности, приведены на рис. 3.10. Ток электрода определяется расходом кислорода в данной последовательности реакций и, следовательно, пропорционален концентрации допамина.

Градуировочные кривые зависимости стационарного тока от концентрации допамина, полученные в 0,1 М фосфатном буферном растворе (рН 6,5) при 25°C, линейны в диапазоне от 0,2 до 1,2 мМ. Время отклика сенсора составляет 1–3 мин. При хранении электрода в буферном растворе его характеристики остаются неизменными не менее недели.

Существование этого биосенсора показывает, что при тщательном подборе растительных материалов возможно создание тканевых сенсоров катехоламиновых нейротрансмиттеров.

3.11. Тирозиновый биосенсор

В работе [43] описан амперометрический тирозиновый биосенсор на основе ткани сахарной свеклы (*Beta vulgaris altissima*), которую иммобилизуют на поверхности чувствительного к кислороду датчика. В этом сенсоре используют активность содер-

жащегося в свекле фермента тирозиназы и контролируют потребление кислорода. На поверхности датчика кусочек свеклы удерживают обычной диализной мембраной. Градуировочные кривые сенсора получают в фосфатном буферном растворе с pH 7,0 при 25 °С.

Градуировочный график линеен в диапазоне от 0,1 до 0,4 мМ тирозина; возможно также использование части кривой до концентрации 0,9 мМ. Сенсор работает стабильно не менее восьми дней, а его время отклика составляет несколько минут. Селективность сенсора к тирозину ухудшается в присутствии таких веществ, как дигидрокси-фенилаланин, 2,4-дихлорфенол и *n*-хлорфенол, которые сами по себе вызывают значительный отклик сенсора.

3.12. Цистеиновый биосенсор

Для конструирования биосенсоров можно эффективно использовать и другие виды растительных материалов. Например, для определения цистеина на поверхности аммонийного датчика иммобилизуют модифицированные листья огурца. Вообще листья растений, по-видимому, имеют много преимуществ как биокатализаторы благодаря своему строению. Многие листья имеют многослойную структуру, включающую восковое покрытие (кутикулу) с внешней стороны листа, слой эпидермальных клеток (эпидермис) и примыкающий к нему губчатый промежуточный слой; те же слои повторяются в обратном порядке на другой стороне листа. Кутикула обладает гидрофобными свойствами, однако проницаема для газов. Газообмен осуществляется через небольшие отверстия на поверхности листа, называемые устьицами. Губчатый промежуточный слой наиболее активен в метаболических процессах с участием газов. Для получения биокаталитических мембранных электродов срезают кутикулу с наружной или нижней стороны листа и помещают оставшуюся часть листа на газочувствительный потенциометрический электрод так, чтобы открытый эпидермальный слой находился в контакте с анализируемым раствором, а газопроницаемая восковяз кутикула – с внутренними элементами сенсора.

Этот принцип был продемонстрирован, в частности, при разработке L-цистеинового биосенсора с использованием огуречных листьев и аммиачного датчика [45]. В листьях огурца содержится фермент L-цистеиндисульфидгидролаза, катализирующий реакцию



Таким образом, в цистеиновых сенсорах можно использовать электроды, чувствительные либо к NH_3 , либо к H_2S , хотя из химических соображений первые предпочтительнее.

Методика изготовления цистеинового биосенсора довольно проста. Огурцы (*Cucumis sativus*) выращивают из семян в почве для рассады. По мере необходимости отрывают зрелые листья и вымачивают их в воде в течение 45 мин. При вымачивании кутикула размягчается и легко удаляется, обнажая биохимически активный эпидермис. Эта процедура необходима, так как субстрат, L-цистеин, с трудом диффундирует через восковый слой кутикулы. Затем из листа вырезают диск нужного размера, помещают его на торец газового датчика и закрепляют диализной мембраной.

В фосфатном буферном растворе с pH 7,6 электродная функция такого биосенсора характеризуется наклоном около 35 мВ/рС в диапазоне от 10^{-3} до 10^{-5} М. Такой относительно низкий наклон градуировочной кривой, наряду с довольно большим временем отклика, свидетельствует о необходимости дальнейшего совершенствования этого биосенсора. Однако благодаря большому сроку службы сенсоров (до четырех недель) и исключительно низкой стоимости листьев и их фрагменты как биокатали-

заторы вполне могли бы конкурировать с иммобилизованными ферментами или клетками.

3.13. Митохондриальный биосенсор

Наряду с цельными фрагментами тканей млекопитающих в биосенсорах можно эффективно использовать фракции тканевых клеток, иммобилизуя именно те субклеточные компоненты, которые обладают наибольшей биокаталитической активностью. Такой подход может быть весьма плодотворным, если необходимо увеличить количество иммобилизованного фермента или улучшить избирательность сенсора, устраняя мешающие ферменты, которые содержатся в других частях клетки. Показано, что некоторые субклеточные фракции можно использовать как аналитические реагенты. Так, для определения тироксина можно использовать микросомы печени крысы [34]. Первой удачной попыткой создания биосенсора на основе субклеточной фракции был биосенсор для определения глутамина [8]. В этом сенсоре митохондриальную фракцию клеток кортекса почки свиньи иммобилизовали на газоаммиачном датчике. Митохондрии содержат два изофермента глутаминазы [15], активность которых и используют в глутаминовом биосенсоре.

Митохондриальную фракцию клеток почки свиньи выделяют по стандартной методике, включающей дифференциальное центрифугирование [26]. Полученную митохондриальную фракцию иммобилизуют с помощью обычной диацетицеллюлозной диализной мембраны. Собранные биосенсоры помещают в буферный раствор (0,120 М хлорида калия, 0,02 М Трис-хлорида, 0,04 М Трис-фосфата, 0,005 М сукцината, 1 мкг/1,5 мл ротенона, 0,02% азида натрия) с pH 8,5. Сенсоры хранят и используют при комнатной температуре.

Аналитические характеристики митохондриального электрода сравнимы с характеристиками тканевых и бактериальных электродов и намного превосходят полученные в системе с выделенным ферментом (табл. 3.2). Селективность митохондриального глутаминового биосенсора оказалась очень высокой [8].

Успех в создании митохондриального биосенсора показывает, что субклеточные материалы могут служить эффективными биокатализаторами. Хотя это и не относится к рассмотренному глутаминовому биосенсору, субклеточные фракции можно использовать для улучшения чувствительности и избирательности биосенсора в тех случаях, когда цельные фрагменты тканей не обладают необходимыми свойствами.

3.14. Механизм отклика тканевого биосенсора

Механизм функционирования электродов на основе тканей растительного или животного происхождения еще не установлен. До сих пор фактически не проводилось фундаментальных исследований, касающихся механизмов переноса молекул субстратов и продуктов в тканевом биокаталитическом слое. Выяснение механизма транспорта важно для более широкого и эффективного использования тканевых материалов в качестве аналитических реагентов.

Субстрат должен транспортироваться внутри биокаталитического слоя таким образом, чтобы вступать в контакт с ферментом в клетках ткани. Понятно, что прежде чем вступить в контакт с ферментом, субстрат должен проникнуть внутрь иммобилизованной клетки. Кроме того, необходимо учитывать транспорт из клеток вещества, непосредственно определяемого электродом. Дело осложняется еще и тем, что основной фермент может локализоваться в специфических внутриклеточных органеллах, а это предполагает наличие дополнительных механизмов переноса субстрата в органеллы и внутри них и вывода продуктов. Экспериментальные [10] и теоретические [13]

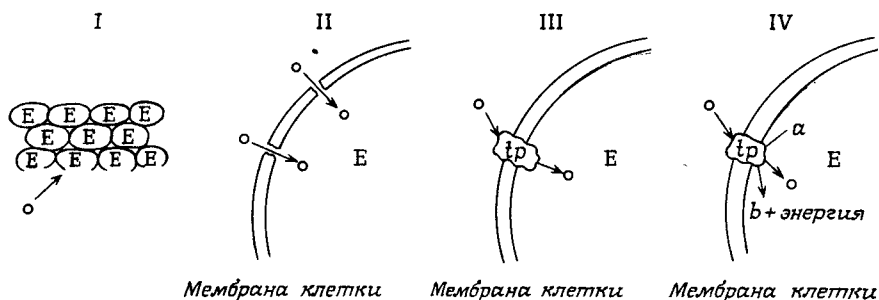


Рис. 3.11. Схематические изображения моделей взаимодействия субстрат - фермент в тканевых биосенсорах. \circ - субстрат; E - активный фермент; tr - транспортный белок.

исследования зависимости аналитических характеристик биосенсора от процесса диффузии субстрата в биокаталитическом слое указывают на то, что выяснение механизмов транспорта имеет важное прикладное значение, поскольку от них зависят аналитические свойства тканевых биосенсоров.

Для описания взаимодействия между субстратом и ферментом в тканевом биокаталитическом слое предложено несколько моделей, схематически представленных на рис. 3.11.

Модель I описывает случай, когда наружные клетки тканевого слоя полностью разрушаются, выделяя основной фермент на поверхность сенсора. По мере старения электрода остатки мертвых клеток удаляются с его поверхности, а экспонируемый при этом свежий слой клеток генерирует новую порцию фермента. В этой модели исключаются осложнения, связанные с входом субстрата в клетки. Необходимо, чтобы скорость высвобождения фермента была постоянной (это согласуется с наблюдаемой высокой воспроизводимостью результатов) и низкой (чтобы обеспечить достаточное количество фермента в течение длительного периода, например 30 дней).

В работе [3] в предварительных исследованиях оценивали структурную целостность клеток ткани почки свиньи. С этой целью кусочек ткани суспендировали в небольшом количестве 0,1 М фосфатного буферного раствора (рН 7,8), содержащего 0,02% азидата натрия. Суспензию оставляли на ночь при комнатной температуре, затем центрифугировали и отделяли клетки. В растворе под осадком определяли фермент глутаминазу, активность которой используется в глутаминовом биосенсоре, и обнаружили лишь небольшое ее количество. Полученный при центрифугировании осадок почечных клеток вновь суспендировали в свежем буферном растворе. Эту смесь опять выдерживали в течение ночи при комнатной температуре и центрифугировали. Во второй раз в растворе под осадком не обнаружили глутаминазной активности, хотя в самих почечных клетках содержание фермента было довольно велико.

Приведенные выше результаты показывают, что целостность клеток сохраняется, по крайней мере в начале использования почечных клеток в качестве биокатализатора. Небольшое количество глутаминазы в первом растворе, вероятно, выделяется из фрагментов клеток, образующихся при вырезании кусочка ткани из целого органа.

Модель II описывает возможный случай, когда иммобилизованные клетки повреждены в достаточной степени, чтобы обеспечить свободную диффузию молекул субстрата и продукта внутрь клеток и наружу, но не настолько, чтобы основной фермент диффундировал с поверхности электрода. Проведенное недавно исследование проницаемости клеток показало, что такие каналы могут образовываться во внешних мембранах как прокариотических, так и эукариотических клеток, например при

осмотическом шоке и циклах замораживания – размораживания [18]. Подобные каналы, возможно, образуются в иммобилизованных кусочках тканей в процессе сборки электрода либо при промывании тканевого слоя водой, либо при оттаивании предварительно замороженного тканевого материала.

Модели III и IV соответствуют случаям, когда на поверхности электрода клетки иммобилизованной ткани остаются неповрежденными. Модель III предполагает наличие специфических транспортных белков, помогающих субстрату проходить через клеточную мембрану. В модели IV помимо транспортного белка требуется наличие внутри клетки источника энергии, затрачиваемой в процессе переноса. Необходимость источника энергии делает последнюю модель маловероятной, поскольку жизнеспособность клеток в биосенсорных системах вызывает весьма серьезные сомнения.

В настоящее время имеется мало сведений о предложенных здесь механизмах. Мы рассматриваем эти модели как отправную точку для исследования механизма формирования сигнала тканевых сенсоров.

Как показано в этой главе, в разработке биочувствительных датчиков на основе тканей достигнуты заметные успехи. В будущем в этом направлении можно ожидать появления новых сенсоров для различных биологически важных соединений. Предстоит еще изучить возможности применения новых классов тканевых материалов, например тканей насекомых или водорослей. Совершенно необходимы фундаментальные исследования строения биокаталитических слоев из фрагментов тканей. Наконец, необходимо рассмотреть возможность применения тканевых биокатализаторов в сочетании и с другими методами анализа. Действительно, основные преимущества тканевых слоев – стабильность и высокая биокаталитическая активность – существенны и в других аналитических методах, включающих биокатализ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Arnold M. A.* An introduction to biocatalytic membrane electrodes. *Amer. Lab.*, **15**, 34–40 (1983).
2. *Arnold M. A.* Tissue-based biocatalytic membrane electrodes. Ph. D. Dissertation, University of Delaware, Section I, 1982.
3. *Arnold M. A.* Tissue-based biocatalytic membrane electrodes. Ph. D. Dissertation, University of Delaware, Section II, 1982.
4. *Arnold M. A., Fioocchi J. A.* Rabbit muscle acetone powder as biocatalyst for adenosine 5'-monophosphate biosensor. *Anal. Lett.*, **17**, 2091–109 (1984).
5. *Arnold M. A., Glazier S. A.* Jack bean meal as biocatalyst for urea biosensors. *Biotech. Lett.*, **6**, 313–18 (1984).
6. *Arnold M. A., Meyerhoff M. E.* Ion-selective electrodes. *Anal. Chem.*, **56**, 20R–48R (1984).
7. *Arnold M. A., Rechnitz G. A.* Determination of glutamine in cerebrospinal fluid with a tissue-based membrane electrode. *Anal. Chim. Acta*, **113**, 351–4 (1980).
8. *Arnold M. A.* Comparison of bacterial, mitochondrial, tissue and enzyme biocatalysts for glutamine selective membrane electrodes. *Anal. Chem.*, **52**, 1170–4 (1980).
9. *Arnold M. A.* Selectivity enhancement of a tissue-based adenosine sensing membrane electrode. *Anal. Chem.*, **53**, 515–8 (1981).
10. *Arnold M. A.* High activity membrane electrode for adenosine 5'-monophosphate using rabbit muscle tissue as biocatalyst. *Anal. Chem.*, **53**, 1837–42 (1981).
11. *Arnold M. A.* Optimization of a tissue-based membrane electrode for guanine. *Anal. Chem.*, **54**, 777–82 (1982).
12. *Arnold M. A.* Substrate consumption by biocatalytic potentiometric membrane electrodes. *Anal. Chem.*, **54**, 2315–17 (1982).
13. *Carr P. W., Bowers L. D.* Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry. Wiley, New York, 1980.
14. *Conway E. J., Cooke R.* The deaminases of adenosine and adenylic acid in blood and tissues. *Biochem. J.*, **33**, 479–92 (1939).
15. *Crompton M., McGivan J. D., Chappel J. B.* The intramitochondrial location of the glutaminase isoenzymes in pig kidney. *Biochem. J.*, **132**, 27–34 (1973).
16. *Dixon M., Kleppe K.* D-amino acid oxidase; II. Specificity, competitive inhibition, and reaction sequence. *Biochim. Biophys. Acta*, **96**, 368–82 (1965).

17. Dixon M., Webb E.C. Enzymes (2nd ed.). Academic Press, New York, 1964.
18. Felix H. Permeabilized cells. *Anal. Biochem.*, **120**, 211–34 (1982).
19. Fernley H.H., Walker P.G. Studies on alkaline phosphatase; inhibition by phosphate derivatives and the substrate specificity. *Biochem. J.*, **104**, 1011–8 (1967).
20. Fishman W.H., Green S., Inglis N.I. L-phenylalanine: an organ specific, stereospecific inhibitor of human intestinal alkaline phosphatase. *Nature (London)*, **198**, 685–86 (1963).
21. Ghosh N.K., Fishman W.H. On the mechanism of inhibition of intestinal alkaline phosphatase by L-phenylalanine; I. Kinetic studies. *J. Biol. Chem.*, **241**, 2516–22 (1966).
22. Guilbault G.G. Analytical uses of immobilized enzymes. Marcel Dekker, New York, 1984.
23. Guilbault G.G., Hrabankova E. New enzyme electrode probes for D-amino acids and asparagine. *Anal. Chim. Acta*, **56**, 285–90 (1971).
24. Guilbault G.G., Smith R.K., Montalvo J.G., Jr. Use of ion selective electrodes in enzymic analysis; cation electrodes for deaminase enzyme systems. *Anal. Chem.*, **41**, 600–605.
25. IUPAC Analytical Chemistry Division. Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes. *Pure Appl. Chem.*, **48**, 127–32 (1976).
26. Johnson D., Lardy H. Isolation of liver or kidney mitochondria. In *Methods in Enzymology* (eds. R.W. Estabrook, M.E. Pullman), vol. X. Academic Press, New York, 1967.
27. Kay H.D. Phosphatase in growth and disease of bone. *Physiol. Rev.*, **12**, 384–442 (1932).
28. Kobos R.K. Potentiometric enzyme methods. In *Ion-selective electrodes in analytical chemistry* (ed. M. Freiser), vol. II, chapter 1. Plenum, New York, 1980.
29. Kuriyama S., Rechnitz G.A. Plant tissue-based biocatalytic membrane electrode for glutamate. *Anal. Chim. Acta*, **131**, 91–6 (1981).
30. Kuriyama S., Arnold M.A., Rechnitz G.A. Improved membrane electrode using plant tissue as biocatalyst. *J. Membr. Sci.*, **12**, 269–78 (1983).
31. Macfarlane M.G., Patterson L.M.B., Robison R. The phosphatase activity of animal tissue. *Biochem. J.*, **28**, 720–24 (1934).
32. Mascini M., Jannelle M., Paleschi G. A liver tissue-based electrochemical sensor for hydrogen peroxide. *Anal. Chim. Acta*, **138**, 65–9 (1982).
33. Meyerhoff M.E., Fraticelli Y.M. Ion-selective electrodes. *Anal. Chem.*, **54**, 27R–44R (1982).
34. Meyerhoff M.E., Rechnitz G.A. Microsomal thyroxine measurements with iodide selective membrane electrode. *Anal. Lett.*, **12**, 1339–46 (1979).
35. Papastathopoulos D.S., Rechnitz G.A. Highly selective enzyme electrode for 5'-adenosine monophosphate. *Anal. Chem.*, **48**, 862–4 (1976).
36. Rechnitz G.A. Biochemical electrodes using tissue slice. *Chem. Eng. News*, **56**, (Oct. 9), 16 (1978).
37. Rechnitz G.A. Bioselective membrane electrode probes. *Science*, **214**, 287–91 (1981).
38. Rechnitz G.A. Bioselective membrane electrodes using tissue materials as biocatalysts. *Methods in enzymology* (ed. K. Mosbach), Vol. 137. Academic Press, San Diego, 1988.
39. Rechnitz G.A., Arnold M.A., Meyerhoff M.E. Bio-selective membrane electrode using tissue slices. *Nature (London)*, **278**, 466–7 (1979).
40. Ronca-Testoni S., Raggi A., Ronca G. Muscle AMP aminohydrolase; III. A comparative study on the regulatory properties of skeletal muscle enzyme from various sources. *Biochem. Biophys. Acta*, **198**, 101–12 (1970).
41. Sammons D.W., Henry H., Chilson D.P. Effect of salts on inhibition of chicken muscle adenosine monophosphate deaminase by phosphate esters and inorganic phosphate. *J. Biol. Chem.*, **245**, 2109–13 (1970).
42. Schubert F., Renneberg R., Scheller F.W., Kirstein L., Plant tissue hybrid electrode for determination of phosphate and fluoride. *Anal. Chem.*, **56**, 1677–82 (1984).
43. Schubert F., Wallenberger U., Scheller F. Plant tissue-based amperometric tyrosine electrode. *Biotech. Lett.*, **5**, 239–42 (1983).
44. Sidwell J.S., Rechnitz G.A. Bananatrode—an electrochemical biosensor for dopamine. *Biotech. Lett.*, **7**, 419–22 (1985).
45. Smit N., Rechnitz G.A. Leaf-based biocatalytic membrane electrodes. *Biotech. Lett.*, **6**, 209–14 (1984).
46. Valle-Vega P., Young C.T., Swaisgood H.E. Arginase-urease electrode for determination of arginine and peanut maturity. *J. Food. Sci.*, **45**, 1026–30 (1980).
47. Zielke C.L., Suelter C.H. Purine, purine nucleoside, and purine nucleotide aminohydrolases. In *The enzymes* (3rd edn.; ed. P.D. Boyer), vol. 4, chapter 3. Academic Press, New York, 1960.

Глава 4

Новые подходы в электрохимическом иммуноанализе

Моника Дж. Грин

Когда в 1959–60 гг. Ялов и Берсон опубликовали свои работы [18, 19] по определению инсулина в плазме с помощью радиоиммуноанализа, они тем самым положили начало новому революционному методу, обеспечивающему точное и селективное определение малых количеств гормонов, ферментов, лекарственных препаратов, вирусов, опухолевых и бактериальных антигенов, многих белков и органических веществ, определять которые до тех пор было трудно или невозможно.

Принцип иммунного анализа прост и основан на взаимодействии исследуемого вещества (лиганда), называемого антигеном (Ag), со специфически связывающимся с ним партнером, называемым антителом (Ab). При этом образуется комплекс антиген/антитело (AbAg):



Константа равновесия (или сродства) этой реакции определяется как

$$K = [AbAg]/[Ab][Ag]. \quad (4.2)$$

Отсюда, при фиксированной концентрации антитела, равновесное отношение концентраций связанного и свободного антигена количественно связано с общей концентрацией лиганда. Это соотношение лежит в основе любого иммуноанализа. Таким образом, если ввести в анализируемую систему фиксированное количество меченого антигена, то можно определить и неизвестную концентрацию антигена. Неизвестную концентрацию антитела определяют при помощи меченых антител. Для введения метки в антитело или антиген можно использовать различные «мечущие» агенты, такие, как радионуклиды, ферменты, красные кровяные клетки, флуоресцентные и хемилюминесцентные зонды или металлы. В радиоиммуноанализе (РИА) и иммуноферментном анализе (ИФА) мечают антиген, а в иммунорадиоиметрическом (ИРМА) и иммуноферментном анализе (ИФМА) анализе – антитело. В большинстве методов иммунного анализа требуется порознь определять связанный и свободный меченый антиген или антитело. Поэтому эти методики довольно громоздки и длительны.

В последнее десятилетие наблюдается усиление тенденции отхода от радиоиммуноанализа и рост числа ферментных иммуноаналитических методов, сопряженных с разнообразными электроаналитическими методами, которые обеспечивают низкие пределы обнаружения. Появляется все больше работ, в которых пытаются связать иммуноанализ с электрохимическими способами детектирования. Более или менее успешно используют как амперометрические, так и потенциометрические методы. Ими мы и ограничимся в этом обзоре. Различия между двумя методами четко определены в других главах этой книги (гл. 9,11). Отметим только, что существо этих различий таково: в амперометрическом анализе измеряют ток, и существует линейное соотношение между током и концентрацией электроактивного вещества, которое либо

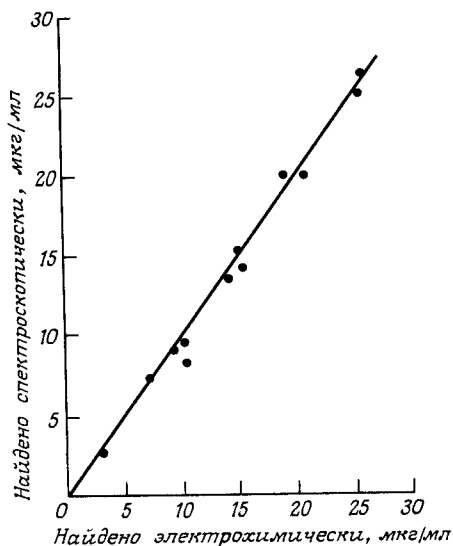


Рис. 4.1. Корреляция между результатами спектрофотометрического и электрохимического определения фенитоина в сыворотке крови пациентов, принимающих фенитоин [5].

окисляется, либо восстанавливается на электроде. В потенциометрическом анализе измеряют изменение потенциала; зависимость потенциала от концентрации является логарифмической, причем в идеальном случае изменение потенциала составляет $59/n$ мВ на десятикратное изменение концентрации (n – число электронов, переносимых в электрохимической реакции).

Описанные к настоящему времени методы электрохимического иммуноанализа можно классифицировать следующим образом (см. также рис. 4.1):

1) Амперометрические иммуноаналитические методики на основе электрода Кларка. В них используются ферменты, которые в присутствии соответствующих субстратов катализируют реакции с поглощением либо с образованием кислорода.

2) Амперометрические иммуноферментные методики, в которых наряду с ферментами используют электрохимическое детектирование продуктов ферментативных реакций.

3) Амперометрические методики, в которых ферменты не используют, но антитело или антиген содержит электроактивную метку.

4) Потенциометрические иммуноаналитические методики, основанные на изменении потенциала при специфическом связывании антигена (антитела) с антителом (антигеном), иммобилизованным на поверхности электрода.

5) Потенциометрические методики, в которых для детектирования используют обычные потенциометрические электроды, например, ионоселективные, CO_2 , аммиачные или pH-электроды.

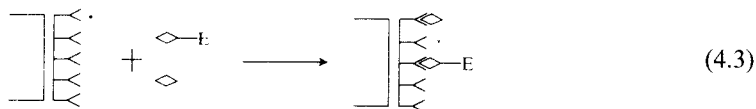
Ниже приведены примеры всех пяти типов методик электрохимического иммуноанализа.

4.1. Амперометрический иммуноанализ с использованием электрода Кларка

Использование кислородного электрода Кларка для детектирования потери или образования кислорода в ферментативной реакции стало интересным шагом в развитии иммуноферментного анализа. В качестве ферментных меток чаще всего используют глюкозооксидазу и каталазу.

В 1979 г. была разработана методика иммуноферментного анализа для определения

человеческого хорионового гонадотропина (hCG) с использованием каталазы, меченой hCG [1]. Авторы [1] иммобилизовали антитело на целлюлозной мембране, которой предварительно придавали определенную форму. Затем мембрану с антителом помещали поверх тефлоновой мембраны кислородного электрода.



В анализируемом растворе меченый и немеченый hCG конкурируют между собой за связывание с антителом на мембране. После этого мембрану промывают, чтобы отделить связанный hCG от свободного, и выдерживают в растворе пероксида водорода. В присутствии каталазы пероксид водорода разлагается с образованием кислорода и воды. Контроль реакции ведут по скорости увеличения давления кислорода. При построении градуировочной кривой предполагается, что сенсор регистрирует активность hCG от 0,02 до 100 международных единиц/1 мл. К сожалению, при использовании одного антитела аналитические свойства сенсора постепенно ухудшаются из-за изменчивости гормонов. Существуют, однако, хорошие моноклональные антитела к α - и β -субъединицам hCG, и анализатор сандвич-типа ELISA (в котором используется немеченый hCG, а метку содержит второе антитело) мог бы стать основой для создания усовершенствованного биосенсора hCG.

Группа японских исследователей [9] недавно использовала каталазные метки для амперометрического определения теофиллина. Принцип этого метода аналогичен рассмотренному методу определения hCG.

В отличие от японских исследователей Реннеберг с соавторами [13] сосредоточились не на выделении, а на поглощении кислорода, что позволило использовать более чем простой ферментный иммуноанализ фактора VIII по связанному с ним антигену. Авторы приспособили глюкозооксидазный электрод [14], чтобы контролировать содержание глюкозы, производимой антителом с меткой щелочной фосфатазы (AP). При этом протекают следующие реакции:

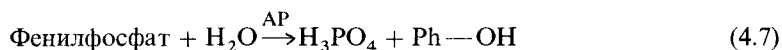


Этот метод представляется несколько громоздким в исполнении и требует относительно дорогих реагентов.

4.2. Амперометрический иммуоферментный анализ

Более изящное использование щелочной фосфатазы как метки продемонстрировано Дойлом и др. [3, 4]. В качестве модельного антигена авторы использовали оросомукоид из сыворотки крови человека, представляющий собой небольшой гликопротеин (молекулярный вес 41 000), который имеет отношение к различным злокачественным образованиям [4] и, по-видимому, связан с карциноэмбриональным антигеном. В этот белок вводили метку щелочной фосфатазы. В системе проходила конкурентная реакция между антителом к белку оросомукоида, иммобилизованном на поверхности кюветы, и белком, меченным ферментом. Через соответствующий промежуток времени кювету промывали и добавляли раствор субстрата – фенолфосфата, который под действием

щелочной фосфатазы превращается в фенол:



Сам субстрат щелочной фосфатазы, фенилфосфат, электрохимически неактивен, а продукт реакции, фенол, активен, и его можно детектировать угольным пастовым электродом жидкостного хроматографа. Этот метод, однако, требует много времени, поскольку он включает 12-часовую инкубацию для протекания конкурентной реакции; затем необходим еще 1 ч для накопления фенола в количестве, достаточном для детектирования. С другой стороны, этот метод исключительно чувствителен и может применяться уже при концентрации субстрата 1 нг/мл.

В иммуноферментном методе часто используют антигены, меченные дегидрогеназами. При этом образование NADH контролируют спектрофотометрически. Прямое электрохимическое окисление NADH изучено достаточно хорошо, и в работе [5] для определения NADH применяли не спектроскопический, а электрохимический метод. Авторы [5] приспособили серийную аппаратуру для определения фенитоина (низкомолекулярное биологически активное вещество) с помощью проточно-инъекционного анализа. Когда были приняты меры к предотвращению загрязнения электрода белками сыворотки крови, удалось достичь хорошего согласия этого метода с используемым в клинических лабораториях рутинным методом анализа сыворотки (рис. 4.1).

4.3. Амперометрический иммуноанализ с использованием антигенов, меченных электроактивными частицами

В 1979 г. две группы опубликовали сообщения о новом методе гомогенного электрохимического иммуноанализа, в котором использовались антигены, меченные электрохимически активными частицами. В обоих случаях использовали небольшие модельные антигены. Уэбер и Пэрди [15] метили морфин ферроценом. Авторы назвали свой метод вольтамперометрическим иммуноанализом. В данном случае вели контроль за окислением ферроцен-морфинового комплекса в присутствии и в отсутствие антител к морфину. Эта реакция лежит в основе метода определения морфина в гомогенных условиях. В присутствии антитела ток, связанный с окислением ферроцен-морфинового комплекса, уменьшается. Авторам удалось показать, что кодеин способен вытеснять морфин из комплекса с антителом, в результате чего ток окисления увеличивается. Уэбер и Пэрди [15] использовали потенциал + 500 мВ (отн. н.к.э.), поэтому могли окисляться и другие частицы, помимо ферроцена в морфиновом комплексе; мешающее влияние, связанное с восстановлением кислорода, отсутствует.

В описанном Хайнеманом и др. [8] методе гомогенного иммуноанализа антиген эстриол метят ацетатом ртути и проводят его конкурентное связывание с антителом. Отделение свободного эстриола от связанного не требуется, поскольку в используемом диапазоне потенциалов эстриол неэлектроактивен. Более того, связанный с антителом меченый антиген восстанавливается при более отрицательном потенциале, чем свободный. Меченый ртутью эстриол восстанавливается при - 300 мВ (отн. н.к.э.); чтобы избежать мешающего влияния кислорода, пробы необходимо тщательно дегазировать. В противном случае при низких концентрациях антигена чувствительность определения снижается. В следующей работе группы Хайнемана [16] с эстриолом как модельной системой электроактивность эстриола изменяли нитрованием. При нитровании эстриола в положения 2 и 4 он становится электроактивным и характеризуется волнами восстановления при - 422 и - 481 мВ относительно хлоридсеребряного электрода сравнения. Это соединение авторы и использовали в гомогенном иммуно-

анализе. Рассмотренные методы гомогенного анализа с применением небольших электроактивных антигенов трудно, однако, распространить на большие белки.

Метод гетерогенного вольтамперометрического иммуноанализа больших молекул разработан Дойлом и др. [3]. В качестве модели авторы использовали сывороточный альбумин человека, модифицированный диэтилентриаминпентауксусной кислотой (ДТПУ) и меченный индием (In^{3+}). Применение индия как металла-метки может показаться экзотикой. Однако обычно его не обнаруживают в заметных количествах в биологических жидкостях, так что уровень фоновых значений весьма низок. Кроме того, индий образует исключительно прочный индекс с ДТПУ ($K_{\text{обр}} = 10^{29}$). Рассматриваемый метод анализа относится к конкурентным методам с фиксированным количеством антигена.

Методика вкратце состоит в следующем. Разделяют свободный и связанный антиген; понижая рН, высвобождают индиевую метку из комплекса с ДТПУ; индий определяют с помощью анодной импульсной растворяющей вольтамперометрии. Метод в принципе весьма чувствителен.

4.4. Потенциометрический иммуноанализ

Эта область вызывает значительный интерес начиная с 1975 г., когда Джаната [10] опубликовал свои наблюдения. Работа Джанаты базировалась на предпосылке, что в водных растворах белки являются полиэлектролитами, и поскольку антитело – это белок, связывание с антигеном должно влиять на его электрический заряд. Поэтому разность потенциалов между рабочим электродом с иммобилизованным антителом и электродом сравнения будет зависеть от концентрации свободного антигена. В качестве модельной системы Джаната использовал лектин конканавалин А, иммобилизованный на поверхности электрода. При добавлении в раствор полисахарида действительно наблюдалось изменение потенциала, но к сожалению, такой же сигнал получался в отсутствие конканавалина А. Отклик овальбуминового электрода на антитела к овальбумину составлял около 2 мВ относительно электрода, содержащего иммобилизованные сывороточные белки. Эти потенциометрические электроды склонны, однако, к неспецифическому связыванию, и, судя по литературе, попытки их использовать не имели особого успеха.

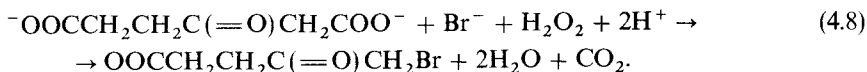
В работе [17] изучали аналогичную систему с электродом из титановой проволоки, на котором иммобилизовали хорионовый гонадотропин человека (hCG) или антитело к нему. В этом случае также обнаружены небольшие (< 5 мВ) изменения потенциала при добавлении соответствующего антитела либо антигена. Таким образом, при прямом измерении разности потенциалов между рабочим электродом и электродом сравнения чувствительность анализа намного ниже, чем в случае амперометрического иммуноанализа с ферментными метками. К аналогичному выводу пришли также авторы [2], исследуя эффективность различных иммуноаналитических методов определения сывороточного альбумина человека. Эти авторы использовали сходные мембраны, содержащие и не содержащие антитела к сывороточному альбумину, и нашли, что обе мембраны, как и ожидалось, обладают одинаковой избирательностью. Использование же амперометрического иммуноферментного анализа обеспечило значительно более высокую чувствительность, что имеет первостепенное значение в иммуноанализе.

4.5. Иммуноанализ с использованием потенциометрических электродов

Несмотря на то что после работ Джанаты [10] были приведены исследования, показывавшие низкую чувствительность потенциометрического иммуноанализа, группой Рехнитца опубликовано значительное число работ, в которых иммуноанализ

сочетается с обычными ионоселективными потенциометрическими электродами, чувствительными к диоксиду углерода, аммиаку, калию. В ранних исследованиях использовали также иодидный и фторидный электроды. Примером может служить работа [7], в которой для повышения чувствительности потенциометрического иммуноанализа наряду с мембранным электродом использовали ферментную метку (аспарагиназу, аденозиндеаминазу или уреазу), пришиваемую к антигену. Наилучшей меткой является, по-видимому, аспарагиназа, поскольку на активность как уреазы, так и аденозиндеаминазы влияет связывание с гаптенем. Этот метод иммуноанализа применяли для определения кортизона в разбавленной крови человека или в плазме. Метод является гетерогенным; антитела к иммуноглобулину (IgG) кролика иммобилизуют на гранулах агарозы, чтобы отделить свободную метку от связанной.

К счастью, потенциометрические методы иммуоферментного анализа не обязательно являются гетерогенными по своей сути. Гомогенные методы удобнее, чем гетерогенные, так как включают меньшее число операций. Фононг и Рехнитц [6] описали метод гомогенного потенциометрического иммуоферментного анализа для человеческого иммуноглобулина G с использованием CO_2 -электрода. В этом методе получают конъюгат IgG, меченный ферментом, и затем ингибируют активность последнего, связывая конъюгат с антителами к IgG. Используемая ферментная метка, хлоропероксидаза, несколько необычна. Это гем-содержащий фермент, который катализирует ряд реакций галогенирования органических молекул в присутствии пероксида водорода и соответствующего галогенида, например бромирования β -кетoadипиновой кислоты. Этот процесс сопровождается образованием CO_2 , что и используют в данном аналитическом методе:



Перед добавлением субстратов требуется выдержать пробу в течение 30 мин. Предел обнаружения IgG составляет несколько мкг/мл. Это значительно ниже обычного клинического диапазона концентраций IgG (8–14 мг/мл). Поэтому перед анализом препараты приходится разбавлять, что также способствует уменьшению влияния матрицы сыворотки крови.

Ионоселективные электроды также можно приспособить для иммуноанализа. Китинг и Рехнитц [11] описали метод потенциометрического ионофорного модуляционного иммуноанализа (ПИМИА) для определения антител (рис. 4.2, а). В этом методе соответствующий антиген связывают с калийселективным ионофором, например, *цис*-дibenzo-18-краун-6 или бензо-15-краун-5. Полученный ионофор-антигенный комплекс иммобилизуют в поливинилхлоридной пленке, содержащей пластификатор, которую закрепляют в качестве мембраны в корпусе обычного ионоселективного электрода. После сборки электрод выдерживают в растворе с постоянной концентрацией калия и измеряют фоновый потенциал. Добавление антитела приводит к связыванию антигенной части антиген-ионофорного комплекса на границе раздела мембрана–раствор. При этом потенциал электрода изменяется пропорционально концентрации антитела. Метод ПИМИА используют для определения антител к дигоксину (рис. 4.2, б). Его основным недостатком является необходимость интенсивного диализа проб для удаления посторонних ионов, поскольку электрод может работать только при фиксированной концентрации калия. Это приводит к относительно большим объемам исследуемых растворов (1–3 мл сывороток) и большой продолжительности диализа, вследствие чего ждать результатов анализа приходится довольно долго.

Те же авторы позднее [12] разработали другой метод определения дигоксина, также с использованием CO_2 -электрода. В этом методе используют полистироловые шарики,

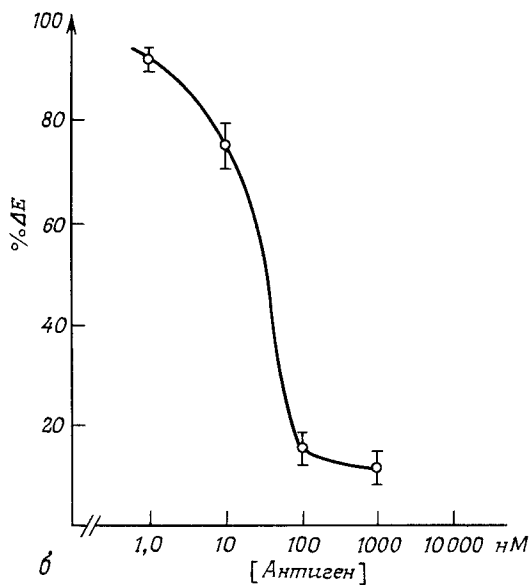
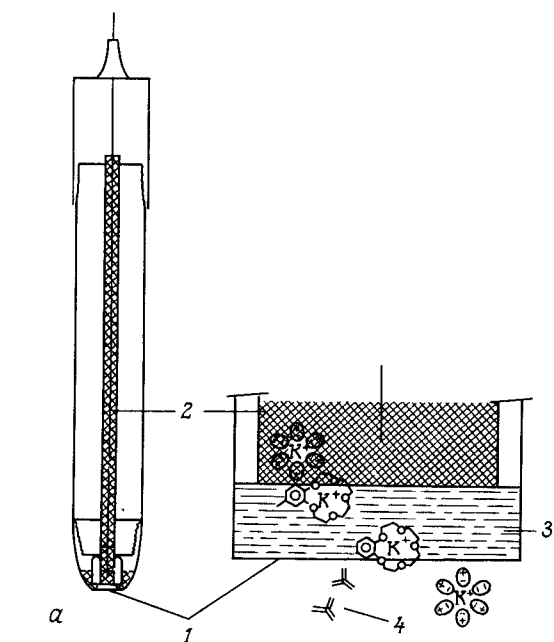


Рис. 4.2. а: Схема потенциметрического ионофорного модуляционного иммуноанализа; 1 - поливинилхлоридная мембрана, содержащая дигоксин-ионофорный комплекс; 2 - 10 мМ раствор KCl; 3 - пластификатор; 4 - антитела к дигоксину. б: Конкурентное связывание дигоксина при постоянной концентрации антитела [11].

покрытые дигоксином, и проводят конкурентную реакцию последнего с антителами к дигоксину, меченному пероксидазой хрена. Суть метода схематически изображена на рис. 4.3, а. Шарики можно отцентрифугировать и затем провести на них ферментативную реакцию между пирогаллолом и пероксидом водорода с образованием CO_2 , детектируемого электрохимически. В этом методе гетерогенного иммуоферментного

анализа не используется ингибирование ферментативной активности. Увеличение концентрации свободного дигоксина приводит к уменьшению заполнения поверхности полистирольных шариков ферментной меткой и к снижению скорости образования CO_2 . Метод чувствителен к пикомолярным концентрациям дигоксина (см. рис. 4.3, б), но, к сожалению, все еще является медленным.

В заключение отметим, что область электрохимического иммуноанализа еще очень молода. Наиболее обещающие результаты как в амперометрических, так и в потенциометрических иммуноаналитических методах, очевидно, достигались в тех случаях,

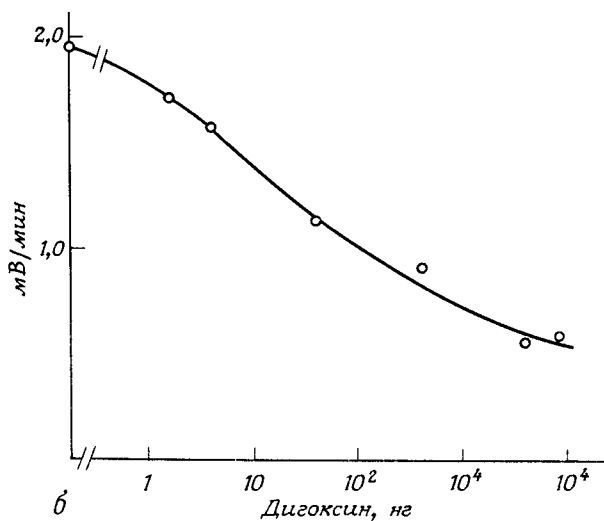
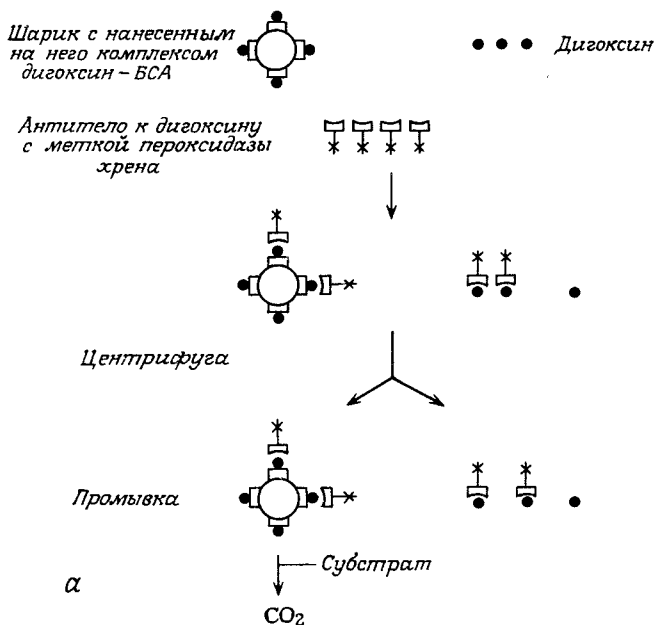


Рис. 4.3. а: Схема ферментного иммуноанализа; б: типичная для иммуноферментного анализа кривая связывания дигоксина [12].

когда метод разрабатывали с учетом специфических требований электрохимического детектирования, а не приспособляли существующий иммуноферментный метод анализа к электрохимическому детектору. Это достаточно хорошо иллюстрируют приведенные в разделах 4.3 и 4.5 примеры использования антигенов, меченных электроактивными частицами, и комбинирования ферментного иммуноанализа с CO_2 - или NH_3 -электродами. Хотя в лабораторных условиях демонстрация иммуно-сенсоров вполне возможна, их широкое внедрение все еще связано со значительными трудностями.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Aizawa M., Morioka A., Suzuki S., Nagamura Y.* Enzyme immunosensor, III. Amperometric determination of human chorionic gonadotropin by membrane bound antibody. *Anal. Biochem.*, **94**, 22-8 (1979).
2. *Aizawa M., Suzuki S.* Chemical amplification in biosensors. *Jap. J. App. Phys.*, **21**, Supplement 21-1, 219-23 (1982).
3. *Doyle M.J., Halsall H.B., Heineman W.R.* Heterogenous immunoassay for serum proteins by differential pulse anodic stripping voltammetry. *Anal. Chem.*, **54**, 2318-22 (1982).
4. *Doyle M.J.* Enzyme-linked immunoabsorbent assay with electrochemical detection for α_1 -acid glycoprotein. *Anal. Chem.*, **56**, 2355-60 (1984).
5. *Eggers H.M., Halsall H.B., Heineman W.R.* Enzyme immunoassay with flow amperometric detection of NADH. *Clin. Chem.*, **28**, 1848-51 (1982).
6. *Fonong T., Rechnitz G.A.* Homogeneous potentiometric enzyme immunoassay for human immunoglobulin G. *Anal. Chem.*, **56**, 2586-90 (1984).
7. *Gebauer C.R., Rechnitz G.A.* Deaminating enzyme labels for enzyme immunoassays. *Anal. Biochem.*, **124**, 338-48 (1982).
8. *Heineman W.R., Anderson C.W., Halsall B.H.* Immunoassay by differential pulse polarography. *Science*, **204**, 865-6 (1979).
9. *Itagaki H., Hakoda Y., Suzuki Y., Haga M.* Drug sensor: an enzyme immunoelectrode for theophylline. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 1283-8 (1983).
10. *Janata J.* An immunoelectrode. *JACS*, **97**, 2914-6 (1975).
11. *Keating M.Y., Rechnitz G.A.* Potentiometric digoxin antibody measurements with antigen ionophore based membrane electrodes. *Anal. Chem.*, **56**, 801-6 (1984).
12. *Keating M.Y.* Potentiometric enzyme immunoassay for digoxin using polystyrene beads. *Anal. Letts.*, **18** (B1), 1-10 (1985).
13. *Renneberg R., Shlosser W., Scheller F.* Amperometric enzyme sensor-based enzyme immunoassay for factor VIII related antigen. *Anal. Letts.*, **16**, 1279-89 (1983).
14. *Urdike S.J., Hicks G.P.* *Nature* (London), **214**, 986 (1967).
15. *Weber S.G., Purdy W.C.* Homogenous voltammetric immunoassay: a preliminary study. *Anal. Letts.*, **12**, 1-9 (1979).
16. *Wehmeyer K.R., Halsall H.W., Heineman W.R.* Electrochemical investigation of hapten-antibody interactions by differential pulse polarography. *Clin. Chem.*, **28**, 1968-72 (1982).
17. *Yamamoto N., Nagasawa Y., Sawai M., Sudo T., Tsubomura H.* Potentiometric investigations of antigen-antibody and enzyme-enzyme inhibitor reactions using chemically modified metal electrodes. *J. Immunol. Methods*, **22**, 309-17 (1978).
18. *Yalow R.S., Berson S.A.* Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J. Clin. Invest.*, **39**, 1157-75 (1960).
19. *Yalow R.S.* Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. *Nature* (London), **184**, 1648-9 (1959).

Глава 5

Диагностика генетических заболеваний человека

Джон М. Оулд, Кей Е. Дэвис

5.1. Введение

Генетические болезни человека являются важной проблемой международного здравоохранения. Например, по оценкам Всемирной организации здравоохранения в мире более 200 миллионов носителей гемоглобинопатий и ежегодно появляется от 200 до 300 тысяч серьезно больных гомозигот или сложных гетерозигот. В кавказских популяциях каждый двадцатый является носителем муковисцидоза – рецессивного повреждения экзокринных желез, приводящего к смерти пораженных этой болезнью в возрасте около 20 лет. При некоторых генетических болезнях, для которых охарактеризованы дефектные белки (например, β -глобин при β -талассемии), можно проводить биохимические тесты на отсутствие генных продуктов в пробах эмбриональной крови. Этот подход, однако, не является общим, поскольку генетическая болезнь не всегда приводит к изменениям белков в эмбриональной крови. В этих случаях особую ценность представляют специфические генные зонды, которые можно использовать независимо от типа исследуемых клеток.

ДНК-рекомбинантная техника позволяет связывать клинический фенотип непосредственно с изменениями в последовательности ДНК соответствующего гена и его ближайшего окружения. Например, описаны различные изменения последовательности оснований в ДНК, приводящие к β -талассемии [21]. Они действуют на различных стадиях экспрессии гена: предотвращают или замедляют транскрипцию ДНК в предшественник мРНК, нарушают процесс превращения предшественника мРНК в мРНК или преждевременно прерывают трансляцию белка. При серповидной клеточной анемии ген β -глобина производится, но с заменой функционально важной аминокислоты, что выражается в изменении в ДНК последовательности GAG на GTG.

Для большинства генетических нарушений основной дефект неясен. Например, все еще не известна молекулярная основа наиболее известного рецессивного состояния – муковисцидоза. В настоящее время молекулярную биологию применяют на практике для локализации хромосомных дефектов, что позволяет поставить антенатальный диагноз и тем самым исключить потенциальные переносчики болезни еще до идентификации соответствующей мутации. В качестве маркеров хромосомальных областей, несущих наследственную мутацию, используют ДНК-зонды; таким образом, результат не зависит от точного знания измененной последовательности в ДНК [3].

5.2. Методики определения генетических болезней

5.2.1. ДНК-зонды

Молекула ДНК представляет собой двойную спираль, которая при обработке щелочью может расщепляться на составляющие ее две комплементарные нити. В соответствующих экспериментальных условиях две цепочки могут вновь соединиться

(реассоциируются водородные связи между основаниями). Этот процесс лежит в основе всех методов гибридизации ДНК. Во всех этих способах используется небольшое количество очищенной однонитевой ДНК, которая выполняет функцию зонда. Такой ДНК-зонд, как правило, содержит метку, и поэтому можно непосредственно следить за его гибридизацией с комплементарной последовательностью в избытке ДНК-мишени. Зонды обычно метят радиоактивными нуклеотидами, так что полученные двухцепочечные гибриды можно идентифицировать на фоне значительно большего количества немеченной ДНК-мишени. В последнее время интенсивно развиваются методы введения меток, не содержащих радиоактивности, например с использованием биотин-дУТР [15], однако ни один из методов еще не достиг чувствительности обычного метода с меткой ^{32}P .

Первые ДНК-зонды для экспериментов по гибридизации получали из мРНК путем обработки ее обратной транскриптазой. Этот фермент копирует молекулы мРНК, синтезируя одноцепочечную молекулу ДНК с комплементарной молекуле мРНК нуклеотидной последовательностью, т.е. полученная РНК может опять соединиться с молекулой мРНК с образованием двухцепочечной гибридной молекулы. Полученные таким способом копии ДНК-зондов (кДНК) метили, вводя радиоактивные нуклеотиды в ходе синтеза, и затем использовали в простых экспериментах по гибридизации ДНК в растворах. Хорошим источником почти чистой глобиновой мРНК являются ретикулоциты, и первыми генами, изученными таким способом (с использованием частично очищенных α -, β - и γ -кДНК), были глобиновые гены. Благодаря этим опытам было обнаружено, что α -талассемия обусловлена утерей участка гена, и в 1976 г. был поставлен [12] первый молекулярно-биологический пренатальный диагноз генетической болезни, показавший, что эмбрион, пораженный α -талассемией, можно выявить по пониженной гибридизации α -кДНК-зонда с амниоцитарной ДНК.

Хотя в экспериментах по гибридизации ДНК в растворах было получено много новых сведений, все же имевшиеся кДНК оказались недостаточно чистыми для дальнейшего использования в молекулярной биологии в качестве зондов. В 1975 г. Саузерн предложил метод блотинга ДНК (мы рассмотрим его ниже), который стал одним из важнейших методов молекулярной биологии после разработки техники рекомбинантной ДНК, позволившей выделить чистые глобиновые кДНК-зонды. В 1978 г. были впервые получены чистые зонды из α -, β - и γ -кДНК человека путем введения двухцепочечных молекул кДНК в плазмиды и выделения рекомбинантных плазмид из инфицированных моноклональных бактерий-хозяев [31].

Разработке техники плазмидных зондов предшествовало успешное клонирование ДНК человека в бактериофагах. Первая попытка составления библиотеки генов человека, по которой можно быстро выделить перекрывающиеся ДНК-фрагменты глобиновых кластеров α - и β -генов, была предпринята в работе [14]. В этих опытах небольшие фрагменты, содержащие индивидуальные глобиновые гены, получали из моноклональных ДНК и затем встраивали в плазмиды для получения геномных плазмидных ДНК-зондов.

Геномные ДНК-зонды обычно представляют собой только часть гена, которая содержит как кодирующую, так и некодирующую последовательности, тогда как кДНК-зонды комплементарны ко всей или к большей части кодируемой последовательности гена. Поскольку длина последовательности ДНК в большинстве генов очень велика (в отличие от глобиновых генов), кДНК-зонды обычно гибридизируются с длинным участком ДНК и, следовательно, с большим числом фрагментов, чем геномные ДНК-зонды. Это может быть весьма выгодно при поиске сайтов полиморфной рестриктазы, но не для выявления генетических нарушений или пренатального диагноза, поскольку наличие в автордиограмме большого числа полос может только затруднять интерпретацию результата. Поэтому более предпочтительны геномные

ДНК-зонды, а в некоторых случаях и очень короткие фрагменты ДНК. Такие фрагменты получают расщеплением геномной плазмиды рестриктазами и выделением необходимых фрагментов ДНК с помощью гель-электрофореза и электроолигоирования из агарозы.

Последним достижением зондовой техники является разработка коротких синтетических олигонуклеотидных зондов. Эти зонды представляют собой химически синтезированные одноцепочечные молекулы ДНК, содержащие всего около 20 пар оснований. Последовательности основания для пары зондов различаются всего одним нуклеотидом. Один зонд является комплементарным к ДНК с нормальной последовательностью, а другой к той же ДНК, содержащей точечную мутацию. Такая пара зондов будет различным образом гибридизоваться с нормальной и мутантной геномной ДНК, и, следовательно, наличие или отсутствие гибридизации можно использовать в качестве диагностического признака при определении генетических нарушений, обусловленных точечными мутациями, таких, как β -талассемия [22].

5.2.2. Введение метки в зонды

5.2.2.1. Ник-трансляция. Это наиболее широко используемый метод введения метки как в плазмидные зонды, так и в фрагменты ДНК. Трансляция метки производится с помощью репарационного фермента, ДНК-полимеразы-1, выделяемой из *Escherichia coli*, и ДНК-азы-1, вводящей метку в двухцепочечную плазмидную ДНК. После введения метки ДНК-полимераза-1 удаляет стоящий перед меткой нуклеотид и добавляет новый фрагмент – дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат к свободной 3'-ОН-группе на другом конце цепи. Радионуклеотид (обычно dCTP) вводят в охлажденную реакционную смесь, которая содержит ферменты, буферные компоненты, плазмиду (50–100 мкг), dATP, dGTP, и dTTP. Смесь можно приготовить по методике, впервые описанной в работе [26], или же воспользоваться коммерческими готовыми наборами для ник-трансляции. Реакцию проводят при 16°С в течение 1 ч в присутствии 50 мкл ^{32}P -dCTP, 3000 Ки/ммоль (PB 10205, фирма Amersham International). После этого реакцию останавливают, добавляя ЭДТА, меченый ДНК-зонд отделяют от невключенной dCTP либо пропусканием по 1 мл смеси через колонку с сефадексом G-100, либо центрифугированием через сефадекс. Выход обычно измеряют, подсчитывая импульсы аликвоты раствора сцинтилляционным счетчиком. Затем двухцепочечный зонд кипятят в течение 5 мин, чтобы превратить его в одноцепочечный, и быстро охлаждают или замораживают, если он не требуется немедленно для гибридизации.

5.2.2.2. Метод гексануклеотидных праймеров. Недавно был разработан альтернативный метод мечения фрагментов ДНК с высокой специфической активностью, заключающийся в использовании определенного гексануклеотида, играющего роль праймера [8]. Преимуществом этого по сравнению с ник-трансляцией является то, что после гель-электрофореза не требуется отделять полученные фрагменты ДНК от геля. Плазменный зонд расщепляют на фрагменты заданной длины и затем подвергают электрофорезу в агарозном геле с низкой температурой плавления. Фрагменты ДНК визуализируют, как обычно, окрашиванием бромистым этидием, гель разрезают и его части, содержащие нужные фрагменты, кипятят в течение 5 мин, чтобы расплавить гель и получить одноцепочечные фрагменты. Далее добавляют смесь гексануклеотидных праймеров с [α - ^{32}P] dCTP (300 Ки/моль), охлажденными dGTP, dATP, dTTP и фрагментом Кленова ДНК-полимеразы-1. Праймеры гибридизируются с фрагментом с образованием двухцепочечных шаблонов, которые затем удлиняются фрагментом Кленова и образуют двухцепочечные меченые зонды. Последние выделяют так же, как в случае ник-трансляции.

5.2.2.3. Концевое мечение. В этом методе меченные различным образом олиго-

нуклеотиды с высокой специфической активностью вводят в начальные участки плазмидных зондов. В одноцепочечные зонды вводят метку ^{32}P со стороны 5'-конца путем фосфорилирования с помощью полинуклеотидкиназы в присутствии $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ АТР. Меченые олигонуклеотиды отделяют от немеченого зонда и свободной $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ АТР либо хроматографически на пластинках с тонким слоем диэтиламиноэтилцеллюлозы, либо электрофорезом в полиакриламидном геле [6].

5.2.3. Рестриктазный анализ

Этот метод, предложенный Саузерном в 1975 г., обычно называют блоттинг-методом Саузерна. Существует множество его модификаций и усовершенствований, и в настоящее время рестриктазный анализ используют во многих вариантах.

В нашей лаборатории этот метод используют для обнаружения гемоглобинопатий. Процедура анализа очень подробно описана в работе [19], и здесь мы изложим ее в общих чертах.

Первым шагом является расщепление геномной ДНК рестрикционной эндонуклеазой. К настоящему времени обнаружено около 90 рестрикционных эндонуклеаз. Все они разрезают ДНК по определенным сайтам в нуклеотидной цепи ДНК, в результате чего получаются фрагменты воспроизводимого размера. Затем пробу расщепленной ДНК (обычно 5 или 10 мкг) помещают в лунку в 0,8%-ном агарозном геле и подвергают горизонтальному гель-электрофорезу. Отрицательно заряженные фрагменты ДНК мигрируют к аноду со скоростью, соответствующей их размеру.—самые маленькие фрагменты путешествуют дольше всего. Гель пропитывают раствором бромистого этидия, при этом фрагменты ДНК становятся видимыми и их можно сфотографировать в ультрафиолетовом свете. Затем, чтобы получить одноцепочечные фрагменты ДНК, гель пропитывают щелочью. После нейтрализации в сильном буферном растворе гель приводят в контакт с нитроцеллюлозным или нейлоновым фильтром, чтобы перенести на последний фрагменты ДНК. При этом фильтр кладут на гель и покрывают сухой бумажной салфеткой, на которую переходят фрагменты ДНК из геля* в том же порядке, в каком они мигрировали в геле. Фрагменты фиксируют на фильтре, высушивая его (если использовали нитроцеллюлозный фильтр), после чего фильтр (с пятнами Саузерна) готов к гибридизации с содержащим радиоактивную метку ДНК-зондом.

Реакцию гибридизации обычно проводят в полиэтиленовом пакете, поместив фильтр между двумя листами толстого полиэтилена, края которых сваривают с трех сторон. Четвертую сторону сваривают после добавления нескольких миллилитров буферного раствора для предварительной пропитки фильтра. Далее фильтр инкубируют при температуре гибридизации в течение короткого периода, что необходимо для сведения фоновой гибридизации к минимуму. После предварительной пропитки буфер выжимают из пакета, добавляют в него 1–2 мл буферного раствора для гибридизации и одноцепочечный зонд с меткой ^{32}P и пакет снова герметизируют. По завершении реакции гибридизации фильтр извлекают из пакета и промывают в жестких условиях (0,1 × SSC, 0,1% SDS при 65° С), чтобы удалить весь негибридизованный зонд. Наконец, фильтр подвергают автордиографии, чтобы локализовать комплементарные фрагменты ДНК, которые гибридизировались с зондом. На проявленной рентгеновской пленке они выглядят как темные полосы. С помощью маркерных фрагментов ДНК известного молекулярного веса размеры гибридизующихся фрагментов можно оценить по расстоянию, которое они проходят в агарозном геле.

* Английское "blot" означает промокать, отсюда и название блоттинг-метода.—Прим. перев.

5.3. ДНК-зонды в диагностике генетических болезней

5.3.1. Обнаружение носителей генетических болезней

Наиболее изученной группой генетических нарушений являются гемоглобинопатии. Для выявления ее носителей разработано много методик, основанных на рестриктазной технике. Известные методы можно разделить на прямые, в которых генетическая болезнь выявляется непосредственно, и косвенные, в которых используется полиморфизм ДНК. В прямых методах обычно требуется выделение генспецифических зондов и установление молекулярных причин генетической болезни. Тем не менее во многих случаях прямой подход невозможен, и приходится использовать косвенный метод. Например, для такой генетической болезни, как мышечная дистрофия Дюшенна, для которой мутантный ген еще не идентифицирован, косвенный метод является единственно возможным для выявления носителей этой болезни и пренатального диагноза [10, 23].

5.3.1.1. Прямое определение. Если генетическая болезнь является результатом делеции ДНК, то для прямого выявления болезни можно использовать геномные ДНК-зонды или кДНК-зонды. При утрате значительного участка хромосомы, комплементарного соответствующему ДНК-зонду, последний не способен гибридизоваться на блотинговой пленке с ДНК, взятой у больного человека. Например, α -талассемия является результатом отсутствия в ДНК обоих α -глобиновых генов. В этом случае гомозиготность можно диагностировать по отсутствию любого фрагмента α -глобинового гена, гибридизующегося с α -генным зондом. Строго говоря, выявление гетерозигот с такими генными делециями не является прямым, поскольку зонд будет гибридизоваться с фрагментами ДНК нормальной хромосомы, дающими идентичное расположение полос на пленке Саузерна. Различие состоит в том, что интенсивность полос на автордиограмме вдвое меньше, чем у нормальной ДНК (если, конечно, количество нормальной и гетерозиготной ДНК одинаковы), однако определить различия в дозах на блотинговых пленках Саузерна технически довольно сложно. При генетических нарушениях, локализованных в X-хромосоме, по отсутствию гибридизации специфического зонда можно выявлять лица мужского пола с дефектным в результате делеции геном [20]. Но и в этом случае выявить носителей болезни женского пола можно лишь регистрируя обуславливаемый гибридизацией сигнал, составляющий по величине половину сигнала равного количества нормальной ДНК.

Для небольших делеций гена или в случае, когда последовательность ДНК-зонда охватывает начало или конец делеции, генетическое нарушение можно установить путем идентификации характерных аномальных фрагментов ДНК на блотинговой пленке Саузерна. У носителя генетического нарушения будут наблюдаться как нормальные, так и аномальные полосы, а у больного человека — только аномальные. Таким способом можно выявить α -талассемию, используя α -глобиновый генный зонд, гибридизующийся в ДНК на участке, соседнем с началом делеции. Небольшие делеции, включающие всего несколько сотен пар оснований, можно детектировать по наличию аномальной полосы, которая располагается ниже полосы нормального рестрикционного фрагмента. Этим способом можно выявлять один из типов β^0 -талассемии, обнаруженный только у индейцев (рис. 5.1.).

Генетические нарушения, связанные с утратой или вставкой в ДНК всего нескольких нуклеотидов, нельзя выявить рассмотренным выше методом из-за недостаточного разрешения полос на блотинг-пленках. Это же относится и к многочисленным генетическим нарушениям, обусловленным точечными мутациями, которые часто не приводят к заметному изменению длины рестрикционных фрагментов. Если, однако, мутация способствует образованию или устранению сайтов, узнаваемых рестрикта-

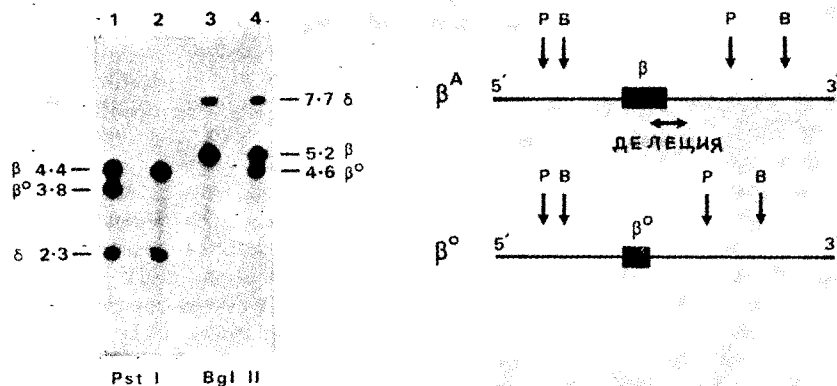


Рис. 5.1. Непосредственное определение одного из типов β^0 -талассемии, обуславливаемого делецией 617 пар оснований на 3'-конце β -глобинового гена. Дефектный β^0 -ген можно определить непосредственно с помощью рестриктаз *Pst* I (P) или *Bgl* II (B), которые имеют распознающие сайты на одной из двух сторон нормального и мутантного β -генов, и поэтому фрагменты ДНК β -гена на 600 п.н. меньше, чем у нормального гена. На автордиограмме показана нормальная ДНК (дорожки 2 и 3) и ДНК гетерозиготного носителя β -талассемии рассматриваемого типа (дорожки 1 и 4). Видны также полосы фрагментов ДНК, содержащих кросс-гибридирующие фрагменты δ -глобинового гена.

зами, ее можно выявить непосредственно с помощью рестриктазного анализа при условии, что требуемые фрагменты ДНК достаточно велики для определения на пленках Саузерна (фрагменты, содержащие менее 50 пар оснований, определить довольно трудно). Хорошим примером такой генетической болезни является серповидная анемия – результат замены всего одного основания А на Т в кодоне 6 β -глобинового гена. Эта мутация приводит к устранению трех несколько различных рестриктазных сайтов узнавания в нормальной последовательности β -гена. Первым двум сайтам, *Msp* I и *Dde* I, соответствуют слишком короткие фрагменты ДНК, чтобы их можно было определить без затруднений. Поэтому в данном случае более предпочтителен разработанный ранее метод анализа связей с использованием близлежащего полиморфного сайта *Hra* I (см. ниже). Однако третий ферментный сайт *Mst* II, обнаруженный в мутационном локусе серповидных клеток, генерирует легко определяемые фрагменты ДНК. На этом подходе основан стандартный метод пренатальной диагностики, хотя точечную мутацию серповидной анемии можно обнаружить и прямым методом с помощью олигонуклеотидных зондов.

Олигонуклеотидные зонды представляют собой синтетические одноцепочечные молекулы ДНК длиной приблизительно в 20 оснований. Такие зонды можно использовать для выявления точечных мутаций. Для этого требуется пара олигонуклеотидных зондов – один комплементарный к нормальной и другой – к мутантной ДНК. Зонды гибридизуют с рестрикционными фрагментами ДНК либо на блотинговых пленках Саузерна, либо в осушенном агарозном геле, и затем фильтр или гель промывают в таких условиях, чтобы плохо сопряженные ДНК-гибриды дестабилизировались и удалялись с фильтра, а гибриды из комплементарных молекул оставались на нем. Этот подход использовали для диагностирования серповидноклеточной анемии, β -талассемии и α -1-антитрипсиндефицита [6, 13, 22].

Хотя показано, что β -талассемия обусловлена по меньшей мере тридцатью точечными мутациями, в каждой отдельной популяции найдено лишь небольшое их число. В некоторых популяциях, например среди жителей Сардинии, за подавляющее большинство случаев β -талассемии ответственна всего одна мутация. В такой популяции использование олигонуклеотидных зондов для пренатальной диагностики β -талассемии особенно удобно. Однако для генетических нарушений с высокой частотой новых мутаций, таких как гемофилия или мышечная дистрофия Дюшене, олигонуклеотидный метод непригоден и приходится прибегать к косвенному методу, в котором используется полиморфизм ДНК.

5.3.1.2. Косвенное детектирование. Разработка наиболее употребительного метода выявления носителей генетических нарушений связана с открытием естественных вариаций в структуре ДНК, случайным образом разбросанных по всему геному.

В этом методе анализируется связывание полиморфизма ДНК с исследуемым мутантным геном. Полиморфизм ДНК обусловлен тем, что из-за вариаций в структуре ДНК утрачиваются существующие или возникают новые сайты узнавания рестриктазы. В результате при обработке рестриктазой у разных людей образуются фрагменты ДНК разной длины, в зависимости от наличия или отсутствия данного сайта. Полиморфные фрагменты наследуются просто по Менделю, поэтому их можно использовать в качестве маркеров как нормальных, так и мутантных генов, при условии что полиморфный фрагмент оказывается достаточно близко к мутантному гену, так что вероятность их рекомбинации весьма мала [3, 11]. Пример такого полиморфизма, называемого полиморфизмом длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ), приведен на рис. 5.2.

В 1978 г. был описан полиморфный сайт Hpa I и показана возможность его использования для диагностики серповидной анемии путем анализа связывания рестрикционных фрагментов [11]. С тех пор в β -глобиновых генных кластерах обнаружено еще более 17 различных полиморфных рестрикционных сайтов. Многие из этих

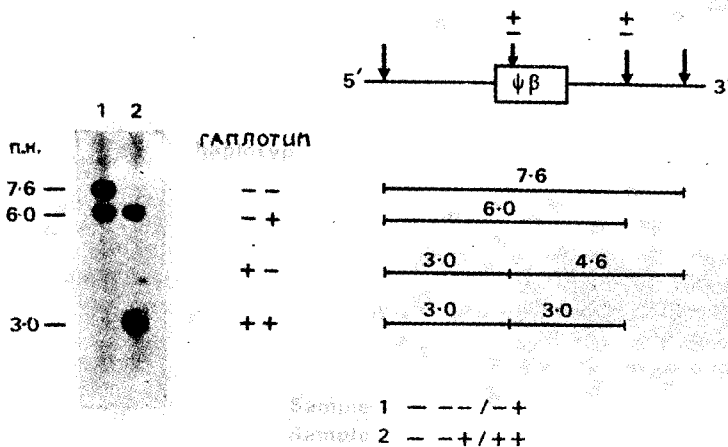


Рис. 5.2. Использование ПДРФ для диагностики β -талассемии путем анализа связывания. Диаграмма показывает локализацию двух полиморфных сайтов $Hind\ II$ (\pm) в β -псевдоглобиновом гене ($\psi\beta$) и вблизи него. С помощью $\psi\beta$ -генного зонда можно определять четыре полиморфных фрагмента в зависимости от комбинации присутствия или отсутствия каждого сайта (гаплотип). Примеры 1 и 2 — гаплотипы двух нормальных людей.

полиморфных сайтов, в частности HbS, HbE и HbC, оказались весьма удобными для выявления носителей и пренатальной диагностики β-талассемии, хотя, чтобы проанализировать связывание полиморфных фрагментов, требуется изучить ДНК не только данной пары риска, но и их рожденных ранее детей и/или родителей и близких родственников (при нарушении связывания ПДРФ, как правило, отсутствует). Данный метод можно использовать и для диагностики многих других генетических нарушений, даже когда их биохимические причины неизвестны, как в случае мышечной дистрофии Дюшене (обзор см. в [7]). В табл. 5.1 приведен перечень генетических болезней, для которых имеются соответствующие ДНК-зонды.

Таблица 5.1. Диагностика болезней с помощью ДНК-зондов

Болезнь	Генный зонд
Гемоглобинопатия	α,β,γ-Глобин [17]
Коллагеновые нарушения	Коллаген [25, 29]
Карликовость	Гормон роста человека [16]
Эмфизема	α-1-Антитрипсин [13]
Синдром Леша – Нихана	Пероксидаза хрена [33]
Фенилкетонурия	Фенилаланингидроксилаза [32]
Рождественская болезнь	Фактор IX [5]
Гемофилия А	Фактор VIII
Дефицит глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы	Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа [24]
Дефицит орнитинтранскарбамилазы	Орнитинтранскарбамилаза [20]
Дефицит антитромбина-3	Антитромбин-3 [2]
Болезни сердца, связанные с нарушением метаболизма холестерина	Рецептор липопротеидов низкой плотности [27]; 3-гидроксиметилглутамил-кофермент А-редуктаза [4]; аполипопротеины [30]
Мышечная дистрофия Дюшене	Связанный ПДРФ [1]
Хорея Хантингтона	То же [9]
Муковисцидоз	Связанный ПДРФ

5.3.2. Пренатальная диагностика

5.3.2.1. Источник эмбриональной ДНК. Для генетического анализа эмбриональную ДНК можно получить либо с помощью амниоцентеза, либо используя яйцевые ворсинки. Амниоцентез представляет собой хорошо отработанную процедуру, которую обычно проводят на 15–16-й неделе беременности. Сразу после разработки в 1978 г. метода определения гемоглобинопатий с помощью рестриктивного анализа была установлена возможность использования для пренатальной диагностики эмбриональной ДНК из культивируемых амниоцитов. Из колбы объединенных амниоцитов получается большое количество эмбриональной ДНК (20–45 мкг). Правда, чтобы клетки доросли до слияния, требуется 2–3 недели. ДНК можно получать из клеток амниотической жидкости и без их культивирования, однако для наработки необходимого для диагностики количества ДНК (5–10 мкг) расходуется большой объем амниотической жидкости. Так, из 40 мл амниотической жидкости авторы выделяли от 3 до 25 мкг ДНК, в среднем 14 мкг.

Эмбриональную ДНК можно выделять также из препарата яйцевых ворсинок, получаемых на 9–11-й неделе беременности, что позволяет поставить диагноз в течение первых трех месяцев. Такая диагностика имеет много существенных преимуществ по сравнению с диагностикой во 2-й трети беременности с использованием ДНК из амниотической жидкости. Есть, однако, риск, что на основе процедуры отбора яйцевых ворсинок еще нельзя дать полную оценку плода. Яйцевые ворсинки являются прекрас-

ным источником ДНК. Из пробы среднего размера получается 25–40 мкг ДНК, то есть более чем достаточно для пренатальной диагностики. Поэтому во многих случаях, чтобы подтвердить диагноз, ПДРФ дополнительно исследуют еще один или два раза.

5.3.2.2. Пример из практики. Рис. 5.3. иллюстрирует постановку диагноза β -талассемии в первые три месяца беременности путем рекомбинационного анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. Сначала, чтобы установить возможность применения этого метода, проанализировали ДНК отца, матери и их нормального ребенка. Полная диагностика оказалась вполне осуществимой при использовании полиморфного сайта *Ava* II мутантного β -глобинового гена ($\Psi\beta$) длиной приблизительно 15 тыс. пар нуклеотидов (п. н.), возникающего в β -глобиновом гене при β -талассемийной мутации. Затем провели пренатальный анализ ДНК из препарата яйцевых ворсинок.

Слева на рис. 5.3 приведено расположение линий в авторадиограммах, полученных при расщеплении ДНК рестриктазой *Ava* II и последующей гибридизации на блотинговых пленках с меченой ^{32}P плазмидой, включающей ДНК гена β -глобина человека. Если сайты *Ava* II присутствуют (знак +) в обеих хромосомах, обнаруживается 3 фрагмента β -глобинового гена длиной 1,1; 2,8 и 3,5 тыс. п. н. Если такой сайт отсутствует (–) в обеих хромосомах, то наблюдается только два фрагмента размером 3,5 и 3,9 тыс. п. н. Таким образом, полоса, соответствующая фрагменту 3,5 тыс. п. н., присутствует постоянно, а фрагмент 3,9 тыс. п. н. возникает в результате сложения двух меньших фрагментов. В случае гетерозиготности у данного полиморфного сайта наблюдаются все четыре полосы, как видно на авторадиограммах ДНК отца и матери (дорожки 1 и 2 соответственно). ДНК нормального ребенка (дорожка 3) содержит только фрагменты 1,1; 2,8 и 3,5 тыс. п. н., что свидетельствует о наличии полиморфного сайта (+) в обеих нормальных хромосомах ребенка и, следовательно, хромосомах родителей (предполагается отсутствие рекомбинации между полиморфным сайтом и геном β -глобина). Таким образом, в этой семье в обеих хромосомах, несущих β -талассемийный ген, полиморфный сайт отсутствует, и его можно использовать как

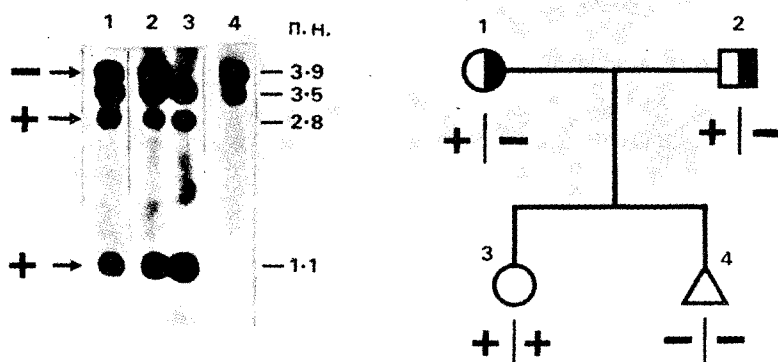


Рис. 5.3. Диагностика β -талассемии в первые три месяца беременности методом рекомбинационного анализа с использованием полиморфного сайта *AVA* II в β -глобиновом псевдогене. На авторадиограмме (дорожки 1 и 2) видно, что мать и отец оба являются гетерозиготными носителями β -талассемии (●, ■). На дорожке 3 для нормального ребенка (○) имеется полиморфный сайт (+/+), а дорожка 4 для эмбриона (△) получается –/–, следовательно, он является гомозиготным носителем β -талассемии.

маркер в пренатальной диагностике. Далее провели анализ ДНК из препарата яйцевых ворсинок (дорожка 4). В этом случае автордиограмма содержит только полосы 3,5 и 3,9 тыс. п.н. Следовательно, у обеих хромосом эмбриона полиморфный сайт отсутствует (-). Отсюда ясно, что эмбрион унаследовал оба β -талассемийных гена и, следовательно, болен β -талассемией.

5.4. Дальнейшие перспективы нерадиометрического детектирования

Момент мечения ДНК-зондов, очевидно, выбирают так, чтобы можно было использовать ^{32}P -нуклеотиды с наивысшей удельной активностью. Введение метки ^{32}P имеет много недостатков, в частности, ее радиоактивность может быть опасна для здоровья. Однако еще важнее, видимо, то, что время полураспада ^{32}P составляет всего 14 дней, поэтому зонды приходится мегить заново каждые 1–2 недели. Использование нерадиоактивных меток в ДНК-зондах позволит преодолеть многие из этих недостатков и разработать диагностические наборы для определения нуклеотидной последовательности ДНК мутантных генов, вирусов, микроорганизмов и т. д.

Хотя в литературе описано много различных способов нерадиоактивного мечения ДНК, к моменту написания этого обзора лишь два из них имели некоторый успех и приобрели коммерческое значение.

Первый подход заключается в том, что вместо ^{32}P -нуклеотида в ДНК-зонд внедряется химически модифицированный нуклеотид, например, биотинированный duTP , аналог dTTP . Модифицированные нуклеотиды внедряются стандартным способом, например ник-трансляцией, но с меньшей скоростью. Гибризованный ДНК-зонд с биотиновой меткой детектируют по его взаимодействию с биотин-связывающими белками, такими как авидин или стрептавидин, в комплексе с ферментами, например пероксидазой хрена, кислот и щелочной фосфатазой, дающими окрашенные продукты, или же с помощью системы двойных антител, используя сначала антибиотиновые антитела и затем флуоресцирующее вторичное тело.

Второй подход заключается в химической модификации ДНК-зонда (например, сульфировании), не влияющей на его способность к гибридизации. Модифицированный ДНК-зонд детектируют с помощью специфических моноклональных антител и затем вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой или щелочной фосфатазой. Ряд фирм выпускают наборы для введения метки в ДНК обоими способами. Однако чувствительность этих систем явно недостаточна для рестрикционного анализа ДНК, целью которого является определение менее 1 пг ДНК, соответствующей единственному гену. Тем не менее такие системы позволяют детектировать 5–10 пг ДНК в блотинговых пятнышках, и их вполне можно использовать в экспериментах по генной инженерии для блотинга по Саузерну, гибридизации бляшек и колоний при детектировании вирусной ДНК в клетках и срезах тканей клинических препаратов, а также для *in situ* гибридизации ДНК-зондов с хромосомами.

Благодарность

Авторы хотели бы поблагодарить Рэчел Китт за терпеливую перепечатку рукописи. Мы также благодарны за финансовую поддержку таким организациям, как The Medical Research Council, The Muscular Dystrophy Group of Great Britain, The Muscular Dystrophy Association of America.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bakker E., Hofker M.H., Goorl N., Mandel J.L., Davies K.E., Kunkel L.M., Willard H.F., Fenton W.A., Sandkuyl L., Majoor-Krakauer D., Van Essen A., Jahoda M., Sachs E.S., Van Om-

- men G. J. B., Pearson P. L. Prenatal diagnosis and carrier detection of Duchenne muscular dystrophy with closely linked RFLPs. *Lancet*, **1**, 655-8 (1985).
2. Bock S. C., Levitan D. J. Characterisation of an unusual DNA length polymorphism 5' to the human antithrombin III gene. *Nucl. Acids Res.*, **11**, 8569-82 (1983).
 3. Botstein D., White R. L., Scolnick M. H., Davis R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, **32**, 312-31 (1980).
 4. Chin D. J., Luskey K. L., Faust J. R., MacDonald R. J., Broum M. S., Goldstein J. L. Molecular cloning of a 3-hydroxyl-methylglutamyl coenzyme A reductase and evidence for regulation of its mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7704-8 (1982).
 5. Choo K. H., Gould K. G., Rees D. J. G., Brownlee G. G. Molecular cloning of the gene for human anti-haemophilic factor IX. *Nature*, **299**, 178-80 (1982).
 6. Conner B. J., Reyes A. A., Morin C., Itakura H., Teplitz R. L., Wallace R. B. Detection of sickle cell β^s -globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 278-82 (1983).
 7. Davies K. E. Molecular genetics of the human X chromosome. *J. Med. Genet.*, **22**, 243-9 (1985).
 8. Feinberg A. P., Vogelstein B. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13 (1983).
 9. Gusella J. F., Wexler M. S., Conneally P. M., Naylor S. L., Anderson M. A., Tanzi R. E., Watkins P. C., Ottina K., Wallace M. R., Sakaguchi A. Y., Young A. B., Shoulson L., Bonilla E., Martin J. B. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, **306**, 234-9 (1983).
 10. Harper P. S., O'Brien T., Murray J. M., Davies K. E., Pearson P. L., Williamson R. The use of linked DNA polymorphisms for genotype prediction in families with Duchenne muscular dystrophy. *J. Med. Genet.*, **20**, 252-4 (1983).
 11. Kan Y. W., Dozy A. M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β -globin structural gene: Relationship to sickle mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5631-5 (1978).
 12. Kan Y. W., Golbus M. S., Dozy A. M. Prenatal diagnosis of α -thalassaemia: Clinical application of molecular hybridization. *N. Engl. J. Med.*, **295**, 1165-7 (1976).
 13. Kidd V. J., Wallace R. B., Itakura K., Woo S. L. C. α_1 -antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene. *Nature*, **304**, 230-4 (1983).
 14. Lawn R. M., Fritsch E. F., Parker R. C., Blake G., Maniatis T. The isolation and characterization of linked δ and β -globin genes from a cloned library of human DNA. *Cell*, **15**, 1157-74 (1978).
 15. Leary J. J., Brigati D. J., Ward D. C. Rapid and sensitive colorimetric method for visualising biotin-labelled DNA probes hybridised to DNA or RNA immobilised on nitrocellulose: bio-blots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4045-9 (1983).
 16. Moore D. D., Conkling M. E., Goodman H. M. Human growth hormone: multigene family. *Cell*, **29**, 285-6 (1982).
 17. Old J. M. Prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. In *Genetic disorders of the fetus*, 2nd edn. (ed A. Milunksy). pp. 599-624. Plenum, New York, 1986.
 18. Old J. M. Fetal DNA analysis. In *Genetic analysis of human diseases: a practical approach* (ed K. E. Davies). IRL Press, Oxford, 1986.
 19. Old J. M., Higgs D. R. Gene analysis. Methods in hematology. In *The Thalassaemias* (ed D. J. Weatherall), vol. 6, pp. 74-102. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983.
 20. Old J. M., Briand P. L., Purvis-Smith S., Howard N. J., Wilcken B., Hammond J., Pearson P., Cathelineau L., Williamson R., Davies K. E. Prenatal diagnosis of OTC deficiency by direct gene analysis. *Lancet*, **1**, 73-5 (1984).
 21. Orkin S. H., Kazazian H. H. The mutation and polymorphism of the human β -globin gene and its surrounding DNA. *Ann. Rev. Genet.*, **18**, 131-71 (1984).
 22. Orkin S. H., Markham A. F., Kazazian H. H. Direct detection of the common Mediterranean β -thalassaemia gene with synthetic DNA probes: an alternative approach for prenatal diagnosis. *J. Clin. Invest.*, **71**, 775-9.
 23. Pembrey M. E., Davies K. E., Winter R. M., Elles R. G., Williamson R., Fazzoni T. A., Walker C. The clinical use of DNA markers linked to the gene for Duchenne muscular dystrophy. *Arch. Dis. Child.*, **59**, 208-16 (1984).
 24. Persico M. G., Toniolo C., Nobile C., D'Urso M., Luzzatto L. cDNA sequences of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in pBR322. *Nature*, **294**, 778-80 (1981).
 25. Prockop D. J., Kivirikko K. I. Heritable diseases of collagen. *N. Engl. J. Med.*, **311**, 376-86 (1984).
 26. Rigby P. J. W., Dieckmann M., Rhodes C., Berg R. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick-translation with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*, **113**, 237-51 (1977).
 27. Russell D. W., Yamamoto T., Schneider W. J., Slaughter C. J., Brown M. S., Goldstein J. L. cDNA cloning of the bovine low density lipoprotein receptor: feedback regulation of a receptor mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 7501-5 (1983).
 28. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-17 (1975).

29. *Sykes B.* A high frequency Hind III restriction site polymorphism with a collagen gene. *Disease Markers*, **1**, 141-6 (1983).
30. *Tolleshaug H., Hobgood K. K., Brown M. S., Goldstein J. L.* The LDL receptor locus in familial hypercholesterolaemia: multiple mutations disrupt transport and processing of a membrane receptor. *Cell*, **32**, 941-51 (1983).
31. *Wilson J. T., Wilson L. B., DeRiel J. K., Villa-Komaroff L., Efstratiadis A., Forget B. G., Weissman S. M.* Insertion of synthetic copies of human globin genes into bacterial plasmids. *Nucl. Acids Res.*, **5**, 563-81 (1978).
32. *Woo S. L. C., Lidsky A. S., Guttler F., Chandra T., Robson K. J. H.* Cloned human phenylalanine hydroxylase gene allows prenatal diagnosis and carrier detection of classical phenylketonuria. *Nature*, **306**, 151-5 (1983).
33. *Yang T. P., Patel P. I., Chinault A. C., Stout J. T., Jackson L. G., Hilderbrand B. M., Caskey D. T.* Molecular evidence for new mutation at the hprt locus in Lesch-Nyhan patient. *Nature*, **310**, 412-4 (1984).

Иммобилизация биологических компонентов в биосенсорах

С. А. Баркер

6.1. Специфические требования к методам иммобилизации в биосенсорах

Если мы поставим задачу выяснить, какие требования предъявляются к методам иммобилизации биологических компонентов в биосенсорах, то в начале списка требований будут фигурировать адаптируемость, надежность, а также возможность связывания биологического компонента с сенсором через молекулы, которые проводят электроны. Хотя в биосенсорах требуются очень малые количества биологического компонента, все же чем он чище, тем выше надежность. Он, (очевидно,) не должен содержать других веществ, которые могли бы взаимодействовать с используемым для анализа или другими ферментами, катализирующими реакции с образованием продуктов, детектируемых выбранным электродом. Для обеспечения надежности требуется также: 1) высокая специфичность биологического компонента; 2) устойчивость системы к колебаниям температуры, ионной силы, pH, окислительно-восстановительного потенциала и химического состава окружающей среды; 3) встроенное приспособление(я), ограничивающее загрязнение или биологическую деградацию биокомпонента или способа его присоединения; 4) должна быть исключена возможность инфицирования пациента (часто это достигается при помощи сенсоров со сменными компонентами).

Под адаптируемостью методов иммобилизации понимают применимость их к ферментам, полифункциональным ферментам и кофакторам, микроорганизмам, лектинам и другим компонентам иммунореакций, а также органеллам, тканевым слоям и липосомам. Метод иммобилизации можно считать пригодным, если после присоединения к носителю биологические компоненты сохраняют активность и стабильность.

Нередко требуется, чтобы электроны переносились от биологического компонента (основной частью которого является фермент) к усилителю или микропроцессору. Первый, но отнюдь не единственно возможный, способ решения этой проблемы предоставляет ферроцен (см. гл. 15). В естественном состоянии клетки обеспечивают такой перенос самыми разнообразными способами. Например, в цитохромах (гемовые белки, основной функцией которых является перенос электрона и/или водорода) это достигается изменением валентного состояния гемового железа. Ключевым моментом в создании сенсора фирмы Yellow Springs Instrument [15] (см. гл. 1) была разработка устройства, защищенного от воздействия других электроактивных веществ крови. Рабочую часть этого сенсора покрывали ацетилцеллюлозной мембраной, образующей вместе с поликарбонатной мембраной Nucleopore своего рода сэндвич с ферментной «начинкой». Для такой слоистой мембраны, содержащей только бычий сывороточный альбумин и не содержащей фермента, было зарегистрировано практически полное отсутствие тока в свежей цельной крови, плазме или сыворотке. Прибор также нечувствителен к мочево́й кислоте, аскорбиновой кислоте, билирубину, молекулярному кислороду и многим лекарственным средствам.

6.2. Введение

При иммобилизации биологического компонента биосенсора мы особенно заинтересованы в таких методах, которые применимы к разнообразным поверхностям. Это расширяет возможности выбора подложки и гарантирует, что не потребуется ее модифицировать. Многие поверхности, на которых проводится иммобилизация, имеют гидроксильные группы, присоединенные к ним непосредственно либо через атомы углерода, кремния и других элементов. Этим и объясняется широкая применимость метода иммобилизации, включающего обработку поверхности тетрахлоридом титана, промывание водой и приведение в контакт с биокомпонентом. В результате между подложкой и биологическим компонентом получается титановый хелат типа сэндвича. Такой хелат не подвержен биологическому распаду и устойчив в широком диапазоне рН, в котором проявляется активность биокомпонентов. Кроме того, подложки с $-NH_2$ - и другими группами могут вести себя по отношению к атомам титана как лиганды. Начальная обработка поверхности тетрахлоридом титана служит для активации, и если необходимо, на этой стадии активированную поверхность можно высушить. После того, как активированную поверхность промыли водой и молекулы воды заместили хлоридные лиганды, поверхность уже нельзя сушить, а необходимо сразу привести в контакт с биокомпонентом [3]. Из всех соображений наиболее важным, по-видимому, является требование, чтобы в иммобилизованном состоянии биологический компонент проявлял максимальную активность, сравнимую с активностью в растворе. Первые методы иммобилизации в большинстве своем сильно снижали активность (до 1–2%), тогда как при помощи тетрахлорида титана для многих ферментов достигается активность выше 50%.)

При определенных обстоятельствах может потребоваться заново покрыть поверхность биокомпонентом. Титановый метод всегда позволяет это делать. Часто стремятся также, чтобы биологически активный компонент а) мог работать в более широком или даже в ином диапазоне рН, чем в растворе; б) становился при иммобилизации более устойчивым; в) мог обходиться без кофермента или г) мог соимобилизоваться с другими биологически активными компонентами. Ни один из методов иммобилизации не удовлетворяет всем этим требованиям, однако в случае титанового метода условия а), б) и г), как правило, выполняются для многих ферментов. Если при функционировании сенсора требуется менять рН, то следует иметь в виду, что микроокружение, образующееся после иммобилизации на поверхности сенсора, может действовать как нерастворимый «буферный агент». Так, свободные amino- и карбоксильные группы позволяют расширить рабочий диапазон фермента соответственно в область более низких и более высоких рН, но не более чем на 2 единицы в каждую сторону. Существенно, чтобы сенсор и его биокомпонент сочетались друг с другом. Это было достигнуто совсем недавно [16] (гл. 15 и 16) путем использования медиаторов (например ферроцена), образующих «сэндвич» с молекулами поверхности сенсора и биокомпонента. Этот подход имеет еще и то преимущество, что можно использовать фермент хинопротеинглюкозодегидрогеназу, и таким образом не требуется кофермент [12]. По-видимому, в данном случае при связывании фермента с подложкой (углерод из электродной ткани) образуются комплексы с переносом электрона. Известным примером такой реакции, который изучают студенты, является взаимодействие между бензолом и гексафторбензолом. Можно ожидать, что в таком связывании будут участвовать ароматические и гетероароматические остатки в ферментах, антигенах и антителах.

Следует также избегать чрезмерного заполнения подложки биологическим компонентом: по мере заполнения активность его вначале растет, но затем при высокой степени заполнения может уменьшиться из-за ограниченного доступа к нему, особенно

там, где биокomпонент взаимодействует с еще одной макромолекулой. Один из способов частичного преодоления этого ограничения – использование подложки с пористой поверхностью [21]. С помощью такой уловки был достигнут успех при работе с глюкоамилазой и трипсином, иммобилизованными на крахмале и казеине соответственно. Оптимальное заполнение подложки биокomпонентом особенно важно для иммуносенсоров, в которых часто имеет место взаимодействие между антигеном и макромолекулой антигена.]

В биосенсорной технологии жизненно важно предотвращение любой утечки биокomпонента в процессе эксплуатации биосенсора. С этой точки зрения мы и будем рассматривать методы иммобилизации или удерживания ферментов и других биокomпонентов, за исключением целых микробных клеток.

6.3. Методы иммобилизации

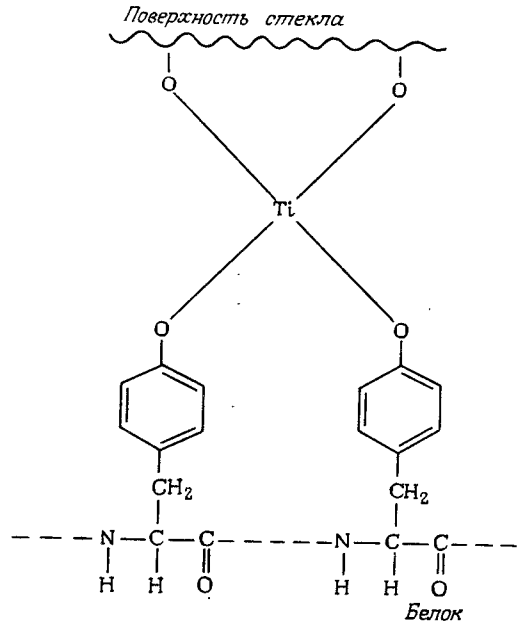
Захват в гелевом носителе имеет много достоинств как метод иммобилизации, особенно для ферментов, субстраты которых невелики и поэтому имеют лучший доступ к ферментам, чем субстраты с большими молекулами. С этой целью используют различные системы, но в последнее время предпочитают альгинатный и желатин/коллагеновый гели с белками, сшитыми поперечными связями. Для сшивки линейных цепей альгината обычно используют ионы Ca^{2+} . Альгинат натрия стерилизуют в автоклаве при 121°C в течение 15 минут, затем смешивают с биологическими компонентами, например клетками *Aspergillus* [23], вводят в 0,1 М раствор CaCl_2 и оставляют затвердевать на 30 мин. Замечено, что при длительном использовании альгината кальция потери его поверхностного слоя минимальны при наименее интенсивном перемешивании. Отмечено также повышение инулазной стабильности клеток *Kluyveromyces marxianus*, иммобилизованных на альгинате кальция с последующей обработкой поверхности геля отверждающими агентами. По сравнению с неотвержденными клетками их стабильность повышается вдвое после обработки глутаровым альдегидом и в шесть раз при обработке смесями гексаметилендиамин/глутаровый альдегид или полиэтиленимин/глутаровый альдегид [2].

При необходимости получения поверхностного покрытия подбирают какую-либо простую процедуру (см., например, рис. 6.1), подобную той, что используется для иммобилизации клеток *Arthrobacter simplex* на стекле. В данном случае подложку обрабатывали коллоидными частицами гидратированного оксида алюминия или же предварительно воздействовали на клетки ионами алюминия [30]. В качестве подложки можно использовать как стеклянные шарики, так и стекловолокно. Для кортизол-преднизолоновой трансформации использовали монослой клеток плотностью $3 \cdot 10^7 - 7 \cdot 10^7$ клеток/см². Достаточно просто осаждения липазы (триацилглицеринацилгидролазы) из раствора охлажденным ацетоном для иммобилизации на кизельгуре. Наибольшая перэтерификационная активность достигнута с кизельгуром Nufflo Supercel при добавлении в органическую фазу уайт-спирита [47].

Для закрепления глюкоамилазы на пористом силикагеле разработана [7] следующая методика: силикагель предварительно обрабатывают тетрахлоридом титана, высушивают и вводят в химическую реакцию с 1,6-диаминогексаном в четыреххлористом углеороде. После промывки его приводят в контакт с глутаровым альдегидом, чтобы закрепить фермент на подложке.

Дрожжевые клетки (поверхность заряжена отрицательно) могут прикрепляться к стеклу (также отрицательно заряженная поверхность) или поликарбонату без использования химических реагентов. Для адгезии требуется лишь, чтобы клетки предварительно хранились в чистой воде. При этом клетки голодают, что приводит к усилению адгезионной способности их стенок [44].

Рис. 6.1. Предполагаемая структура комплекса фермента с поверхностью стекла.



Радиационная графт-полимеризация полиакролеина на полиметилметакрилатовых микросферах активирует частицы для последующей иммобилизации химотрипсина при pH 8,3 [8].

Путем окисления декстрана периодатом, взаимодействия продукта реакции с глицином и борогидридом натрия, а затем сочетания с N^6 -(N-(2-аминоэтил)пропионамид)- NAD^+ (связующим агентом служит 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид) получается связанное с декстраном производное NAD^+ , активность которого в реакциях, катализируемых ADH и LDH, почти равна активности свободного NAD^+ [1].

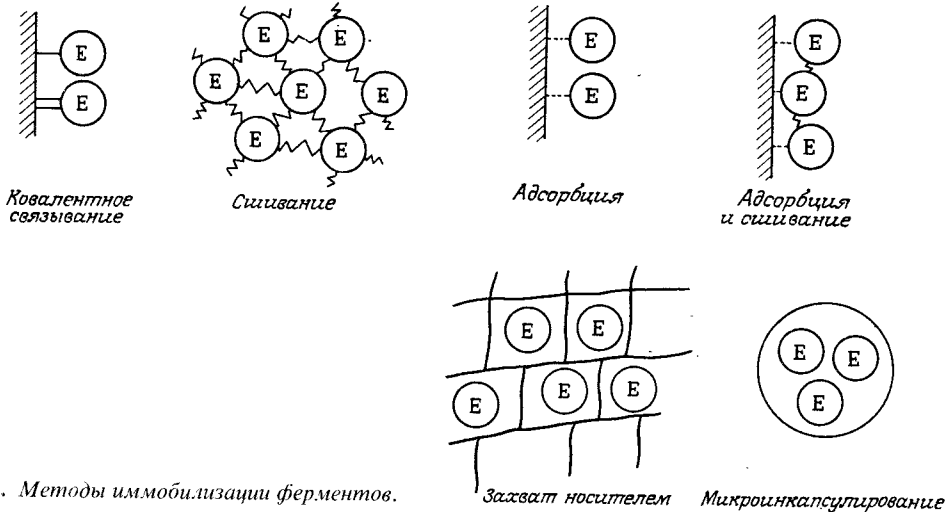


Рис. 6.2. Методы иммобилизации ферментов.

Фирма Genetics International использовала электрод с адсорбированным на нем ферроценом в качестве подложки для глюкозооксидазного электрода [13]. Ранее [14] эта же фирма запатентовала медиаторные соединения, содержащие не менее двух органических циклов, при использовании электродов из углеродной пасты или твердого углерода.

Приведенные примеры иллюстрируют четыре основных подхода в иммобилизации ферментов (рис. 6.2):

- 1) физическая адсорбция на твердой поверхности;
- 2) захват в полимерном геле или в микрокапсулах;
- 3) поперечное связывание с помощью бифункциональных агентов (часто в сочетании со способами 1) и 2));
- 4) ковалентное связывание с реакционноспособной нерастворимой подложкой.

Данные об использовании различных методов иммобилизации ферментов в ферментных электродах и других устройствах приведены в табл. 6.1 и 6.2.

Таблица 6.1. Методы иммобилизации, используемые для изготовления ферментных электродов и термисторов

Метод	Фермент	Литература
Необратимая адсорбция на графите	D-глюкозооксидаза	[18]
Соиммобилизация с FAD на саже, связанной с тефлоном	—»—	[37]
Сшивание при помощи глутарового альдегида с бычьим сывороточным альбумином на электроде Pd — PdO	Уреаза	[38]
Сшивание при помощи глутарового альдегида с бычьим сывороточным альбумином на платине	D-глюкозооксидаза	[46]
Реакция с нерастворимым коллагеном, медиатор диметилсуберимидат	—»—	[31]
Захват в желатиновом слое	L-лизиноксидаза	[36]
Соиммобилизация	D-глюкозооксидаза и каталаза	[11]
Соиммобилизация путем сшивания глутаровым альдегидом с бычьим сывороточным альбумином на Pt фольге	То же	[45]
Адсорбция на частицах CaCO ₃	Бактерии, окисляющие нитрит	[34]
Погружение мембраны с иммобилизованной уреазой в этилендиамин или полилизин	Уреаза	[39]
Сшивание при помощи глутарового альдегида с пористой поликарбонатной пленкой	Глюкозооксидаза	[25]
Захват между Pt пластинкой и пленкой из полиэтиленфталата	—»—	[26]
Прямое O-алкилирование нейлона 6	Уреаза	[4]
Захват между целлофановой диализной и проницаемой для NH ₃ мембранами	Аспарагиназа	[32]
Соиммобилизация на полосках активированного коллагена	Люцифераза и FMN-оксидоредуктаза	[5]
Соиммобилизация путем адсорбции на стеклоуглероде со средним размером пор	FAD и глюкозооксидаза	[28]
Реакция с конканавалином А, связанным с агарозой, активированной цианогенбромидом	Аскорбатоксидаза, β-фруктофуранозоксидаза (ферментный термистор)	[27]
Связывание при помощи глутарового альдегида со стеклом с контролируемыми размерами пор	β-D-Галактозидаза, D-галактозооксидаза (ферментный термистор)	[27]

Продолжение таблицы 6.1

Метод	Фермент	Литература
Связывание при помощи глутарового альдегида с желатином на CO ₂ -чувствительном электроде	L-лизиндекарбоксилаза	[41]
Иммобилизация при помощи глутарового альдегида на электроде Кларка или аналогичном ему	Алкогольоксидаза, каталаза	[43]
Иммобилизация путем покрытия фермента, закрепленного на <i>n</i> -бензохинон-углеродном пастовом электроде, нитроцеллюлозной пленкой	Глюкозооксидаза	[17]
Соиммобилизация с акцептором электронов феррицианидом калия на расплетенной нейлоновой ткани	--	[20]
Иммобилизация на мембране, помещенной на платиновом электроде	Уриказа или глюкозооксидаза	[40]
Соиммобилизация на ариламиновом стекле с контролируемыми размерами пор	β -Фруктофуранозидаза/мугаротаза	[24]
Иммобилизация при помощи глутарового альдегида на поверхности электрода	Аденозиндиаминазы	[6]
Иммобилизация на пористой поликарбонатной мембране	Алкогольоксидаза	[9]
Иммобилизация глутаровым альдегидом в соответствующем буферном растворе между двумя мембранами из эфира целлюлозы	Оксалатоксидаза	[10]
Иммобилизация на пористой стороне ацетилцеллюлозной мембраны	L(+)-Лактатоксидаза	[42]

Таблица 6.2. Методы иммобилизации, используемые в других устройствах *

Метод	Система	Литература
Взаимодействие конканавалина с агарозой, активированной цианогенбромидом	Топографический зонд для изучения белок-белковых взаимодействий с D-галактозилтрансферазой	[48]
Взаимодействие с агарозой, активированной тиольными группами, и анти(иммуноглобулин G)-антителом путем тиол-дисульфидного обмена	Скрининговая система для определения моноклональных антител в растущих культурах	[22]
Использование глюкозооксидазы в качестве метки в иммуноферментном анализе - активной пленкой с ферментом покрывают непосредственно газоселективную мембрану электрода	Компьютеризованная автоматическая система для определения поверхностного антигена (HBsAg) вируса гепатита В в биологических жидкостях	[35]
Иммобилизация иммуноглобулинов на поверхностях диоксида кремния, покрытых активными группами путем химического осаждения паров силана. Этот метод сравним с IgG-иммобилизацией путем тиол-дисульфидного обмена	Иммуносенсоры	[19]

* Иммуносенсоры представляют собой биосенсоры, включающие антитела в качестве селективно связывающих компонентов. К ним относятся ферментные иммуносенсоры, волоконно-оптические флуоресцентные иммуносенсоры, пьезоэлектрические системы, иммуносенсоры на основе полевых транзисторов, оптические системы, микроволновые системы, приборы на основе резонанса поверхностных плазмонов и преобразователи, чувствительные к конформации молекул; см. также посвященный этим устройствам обзор [33].

6.3.1. Адсорбция

Известно, что такие вещества, как оксид алюминия, активный уголь, глина, целлюлоза, каолинит, коллодий, силикагель, стекло, гидроксипатит и коллаген способны адсорбировать ферменты. Этот список, очевидно, можно пополнить ионообменниками, такими как DEAE-целлюлоза, CM-целлюлоза, DEAE-Сефадекс, Дауэкс 50 и множество фенольных смол. Большим преимуществом адсорбции является то, что для нее обычно не требуется никаких реагентов, и необходима лишь минимальная активационная обработка или очистка. По сравнению с химическим связыванием (пункты 3) и 4) в приведенной выше классификации) адсорбция меньше разрушает ферменты. При адсорбции ферменты удерживаются водородными и множественными солевыми связями, ван-дер-ваальсовыми силами и, в подходящих условиях, за счет образования комплексов с переносом электрона. К сожалению, все эти факторы, за исключением последнего, весьма чувствительны к изменению pH, температуры, ионной силы и даже к присутствию субстрата данного фермента.

6.3.2. Захват

При формировании геля в растворе, содержащем фермент, последний захватывается в образующийся гелевый носитель. Контролируя степень сшивки геля, этот метод можно использовать для любого фермента, поскольку в геле белковые молекулы удерживаются трехмерной решеткой. На рис. 6.3 показана структура полиакриламидного геля, применявшегося в ранних разработках ферментного электрода. Кроме

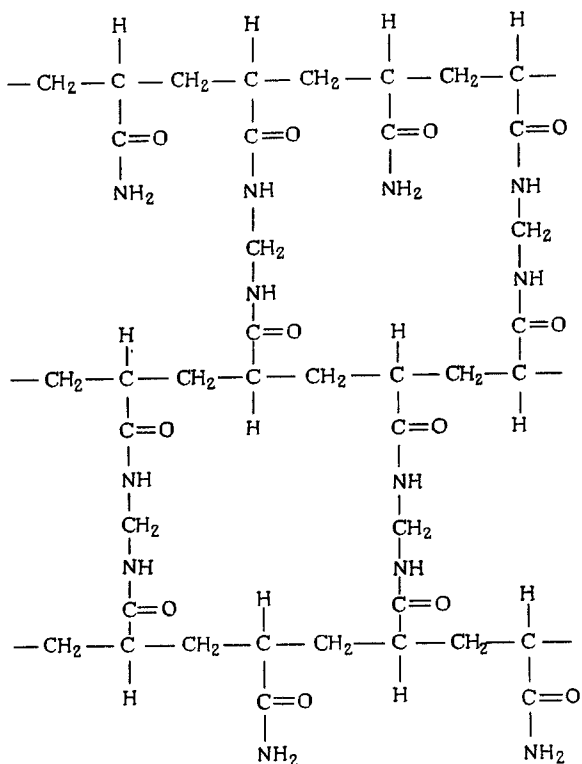


Рис. 6.3. Структура сополимера акриламида с *N,N*-метилен-бис(акриламидом).

того, для иммобилизации ферментов используют также гели крахмала, нейлона и силастика.

К сожалению, этот метод имеет два принципиальных недостатка: 1) гель создает большие диффузионные барьеры для субстратов и образующихся продуктов, что приводит к замедлению реакции, особенно в случаях субстратов с большим молекулярным весом, например рибонуклеазы, трипсина и декстраназы; 2) утечка фермента из геля через крупные поры приводит к непрерывному снижению (ферментативной) активности. Последняя проблема часто решается при помощи поперечной сшивки захваченного белка глутаровым альдегидом.

6.3.3. Сшивание

Связывание фермента с твердой подложкой можно осуществлять с помощью бифункциональных веществ, индуцирующих образование межмолекулярных связей (рис. 6.4). Сшивать фермент с самим собой и дорого, и неэффективно, поскольку при этом часть белкового материала неизбежно будет выступать просто как подложка, и в целом ферментативная активность будет относительно низкой. Недостатком такого подхода являются также диффузионные ограничения и отсутствие жесткости или механической прочности. Бифункциональные реагенты широко применяют для стабилизации физически адсорбированных ферментов сшиванием. В частности, глутаровый альдегид реагирует с лизиновыми аминогруппами фермента и, в случае трипсина, в значительной степени предотвращает саморасщепление пептидной связи вблизи точки закрепления на поверхности. Для таких реакций необходимо подбирать оптимальные условия. Так, перевод лизоцима и папаина в нерастворимую форму быстрее всего идет при pH, близких к изоэлектрической точке.

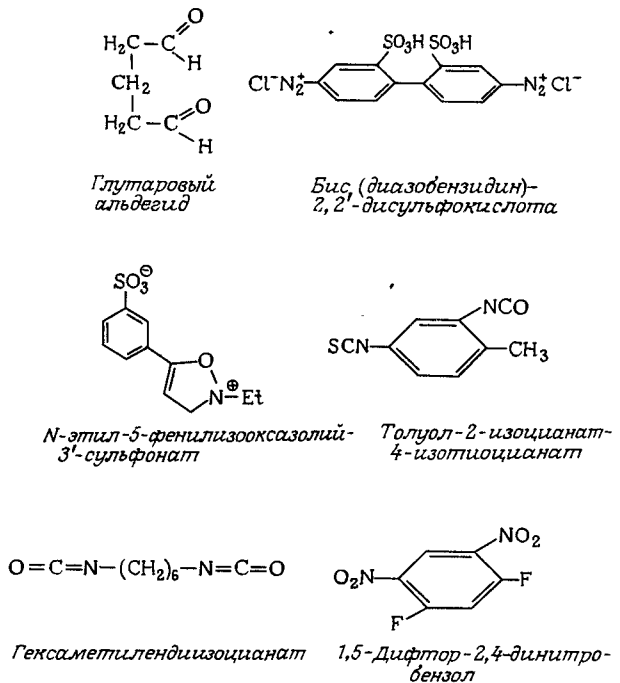


Рис. 6.4. Некоторые бифункциональные реагенты для сшивания белков.

6.3.4. Образование ковалентных связей

На рис. 6.5 приведены наиболее распространенные реакции образования ковалентных связей. Ковалентная связь между ферментом и подложкой должна осуществляться через функциональные группы фермента, несущественные для его катали-

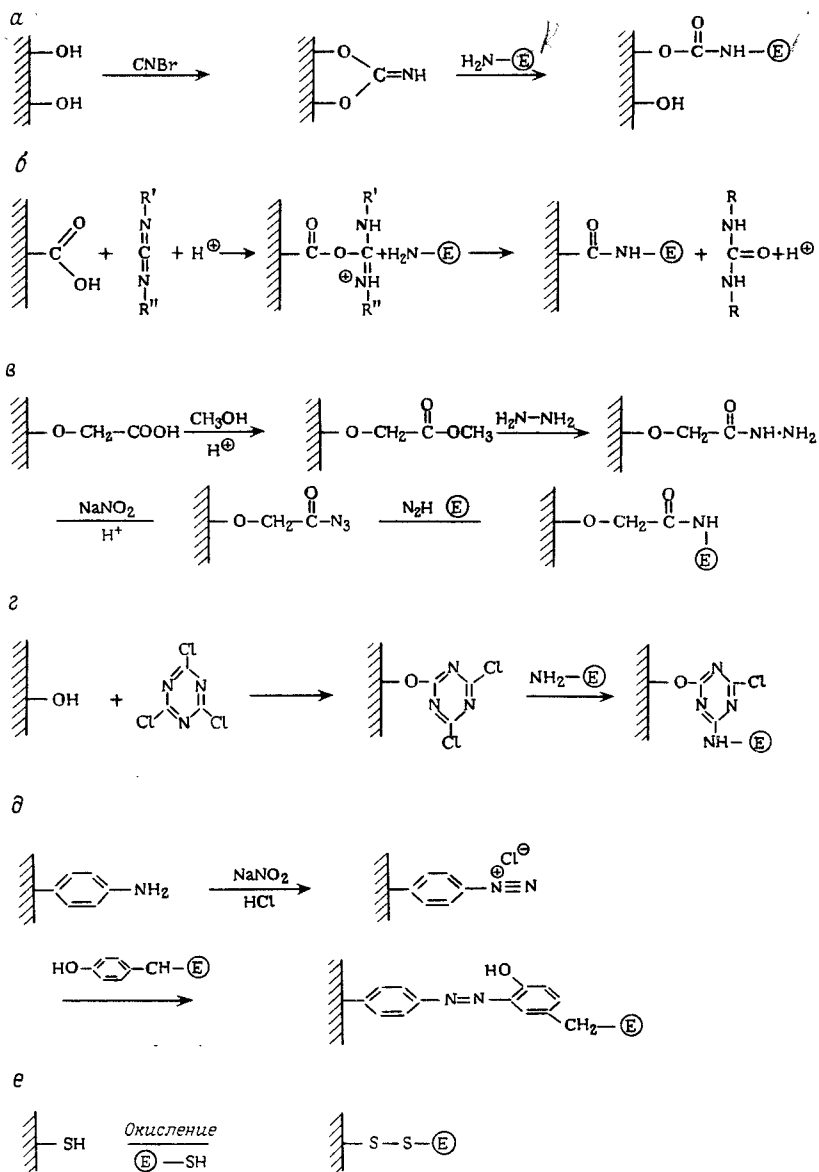


Рис. 6.5. Некоторые реакции, используемые для ковалентного связывания: а — цианогенбромидный метод; б — карбодимидный метод; в — присоединение к ацильным группам путем обработки гидразидами и азотистой кислотой; г — сопряжение с помощью хлорангирида циануровой кислоты; д — сопряжение через диазониевые группы, получаемые из ароматических аминогрупп; е — сопряжение через тиольные группы.

тической активности. Для ковалентного связывания используют нуклеофильные функциональные группы боковых цепей аминокислот белка. Эти группы весьма разнообразны и включают amino-, карбоксильные, гидроксильные, фенольные, имидазольные и тиоловые группы. Ковалентные связи преимущественно образуются при умеренной температуре, невысокой ионной силе и pH, соответствующих физиологической области. Часто связывание проводят в присутствии субстрата, чтобы защитить активный центр фермента. Большим преимуществом ковалентного связывания является незначительность утечки фермента из матрицы, выбираемой с учетом оптимальной пористости, биологической устойчивости и т.д. Разнообразие методов связывания позволяет не затрагивать активный центр фермента в процессе связывания. Тем не менее всегда необходимо специально изучать эффективность связывания, сравнивая, в частности, активности одного и того же количества фермента в растворе и в иммобилизованном состоянии. Выбор метода связывания и матрицы, естественно, следует проводить до полной сборки сенсора. Для начинающих исследователей рекомендуем также обзор [29], в котором, в частности, рассмотрены имеющие важное значение методы иммобилизации и рециклирования коферментов и даны примеры их применения в ферментных электродах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adachi S., Ogata M., Tobata H., Hashimoto K. Effects of molecular weight of dextran and NAD density on coenzyme activity bound to dextran. *Enz. Microb. Technol.*, **6**, 259–62 (1984).
2. Bajpai P., Margaritis A. Improvement of inulinase stability of calcium alginate immobilized *K. marxianus* cells. *Enz. Microb. Technol.*, **7**, 34–6 (1985).
3. Barker S. A., Emery A. N., Novais J. W. Enzyme reactors for industry. *Proc. Biochem.*, **6** (Oct), 11–13 (1971).
4. Begum K. D., Mottolo H. A. Nylon shavings enzyme reactor for batch determination of urea. *Anal. Biochem.*, **142**, 1–6 (1984).
5. Blum L. J., Coulet P. R. Coimmobilisation of luciferase and FMN oxidoreductase in an enzyme electrode. *Anal. Chim. Acta*, **161**, 355–8 (1984).
6. Bradley C. R., Rechnitz G. A. Immobilisation barrier effects on the dynamic response characteristics of potentiometric adenosine deaminase enzyme electrodes—membrane thickness effect etc. *Anal. Chem.*, **57**, 1401–4 (1985).
7. Cabral J. M. S., Cardosa J. P., Novais J. M., Kennedy J. F. A simple kinetic model for the hydrolysis of α -D-glucans using glucamylase immobilised on porous silica. *Enz. Microb. Technol.*, **6**, 365–70 (1984).
8. Clark D. S., Bailey J. E., Yen R., Rembaum A. Enzyme immobilisation on grafted polymeric microspheres. *Enz. Microb. Technol.*, **6**, 317–20 (1984).
9. Clark D. S., Noyes L. K., Grooms T. A., Moore P. E. Direct rapid electroenzymatic sensor for measuring alcohol in whole blood and fermentation products—enzyme electrode using *Hansenula polymorpha* immobilized alcohol oxidase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **434**, 515–19 (1984).
10. Clark D. S. Oxalate sensing enzyme electrode using immobilised barley seedling oxalate oxidase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **434**, 512–14 (1984).
11. Cleland N., Enfors S. O. Control of glucose fed batch cultivations of *E. coli* by means of an oxygen controlled stabilized enzyme electrode containing immobilised glucose oxidase and catalase. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 141–7 (1983).
12. D'Costa E. J., Higgins I. J., Turner A. P. F. Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor. *Biosensors*, **2**, 71–89 (1986).
13. Genetics International. Analytical equipment and sensor electrodes therefore. European Patent 127958, 1984.
14. Genetics International. Measurement of enzyme catalysed reactions. European Patent 125137, 1984.
15. Grooms T. A., Clark L. C., Weiner B. J. The design of peroxide enzyme membrane polarographic sensors for clinical and industrial analysis. In *Enzyme Engineering* (eds. H. H. Weetall and G. R. Royer), vol. 5, p. 217–29. Plenum Press, New York, 1980.
16. Higgins I. J., Hill H. A. O., Plotkin E. V. Measurement of enzyme catalysed reactions. European Patent 125137, 14th Nov. 1984.
17. Ikeda T., Hamada H., Miki K., Senda M. Glucose oxidase immobilised benzoquinone-carbon paste electrode as a glucose sensor. *Agric. Biol. Chem. (Japan)*, **49**, 541–3 (1985).

18. Ikeda T., Katasho I., Kamei M., Senda M. Electrocatalysis with a glucose oxidase immobilized graphite electrode. *Agric. Biol. Chem. (Japan)*, **48**, 1969–76 (1984).
19. Jonsson U., Malmqvist M., Ronnberg I. Immobilization of immuno globulins in silica surfaces: stability for use as immunosensor and in affinity chromatography. *Biochem. J.*, **227**, 363–71 (1985).
20. Kawaguri M., Nankai S., Iijima T. Biosensor. *PCT Int. App. W08403562*, 13 Sept. 1984.
21. Kennedy J.F., Barker S.A., Rosevear A. Preparation of water insoluble trans-2,3-cyclic carbonate derivative of macroporous cellulose and its use as a matrix for enzyme immobilisation. *J. Chem. Soc. Perkin*; 2293–9 (1973).
22. Kimura S., Hayano T., Kato K. Properties and applications to immunoassay of monoclonal antibodies to neuron specific $\gamma\gamma$ enolase. *Biochem. Biophys. Acta*, **799**, 252–9 (1984).
23. Kuek C., Armitage T.M. Scanning electronmicroscopic examination of calcium alginate beads immobilizing growing mycelia. *Enz. Microb. Technol.*, **7**, 121–5 (1985).
24. Masoom M., Townshend A. Simultaneous determination of sucrose and glucose in mixtures by flow injection analysis with immobilized enzymes—invertase/mutarotase column and glucose oxidase column. *Anal. Chim. Acta*, **171**, 185–94 (1985).
25. Matsushita. Biosensor. Japan Kokai Tokkyo Koho JP 59 67, 452, 17th April, 1984.
26. Matsushita. Biosensor. Japan Patent 011896, 4th August, 1984.
27. Mattiassin B., Danielsson B. Calorimetric analysis of sugars and sugar derivatives with aid of an enzyme thermistor. *Carb. Res.*, **102**, 273–82 (1982).
28. Miyawaki O., Wingard L.B. FAD and glucose oxidase immobilised on carbon. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **434**, 520–2 (1984).
29. Mosbach K. Immobilized coenzymes in ligand affinity chromatography and their use as active coenzymes. *Advances in Enzymology*, **46**, 205–78 (1978).
30. Mozes N., Rouxhet P.G. Dehydrogenation of cortisol by *Arthrobacter simplex* immobilized as supported monolayer. *Enz. Microb. Technol.*, **6**, 497–502 (1984).
31. Ngo T.T., Lenhoff H.M. Amperometric assay for collagenase. Amplification by use of GOD conjugated to insoluble collagen. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **8**, 407–14 (1983).
32. Nikolelis D.P. Construction of an immobilised asparaginase sensor and determination of asparagine in blood serum. *Anal. Chim. Acta*, **161**, 343–8 (1984).
33. North J.R. Immunosensors: antibody based biosensors—comparison of construction methods and devices. *U.K. Trends Biotechnol.*, **3**, 180–6 (1985).
34. Okada T., Karube I., Suzuki S. NO_2 sensor which uses immobilized nitrite oxidising bacteria. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 1641–51 (1983).
35. Romette J.L., Boitieux J.L. Oxidase enzyme: enzyme and immunoenzyme sensor—computerized automatic system development: glucose oxidase application. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **434**, 533–5 (1984).
36. Romette J.L., Yang J.S., Kusakabe H., Thomas D. Enzyme electrode for specific determination of L-lysine. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2557–66 (1983).
37. Sonawot H.M., Phadke R.S., Govil G. Covalent immobilization of FAD and glucose oxidase on carbon electrodes using cyclic voltammetry. *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 1066–70 (1984).
38. Szuminsky N.J., Chen A.K., Liu C.C. A miniature Palladium—Palladium oxide enzyme electrode for urea determination. *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 642–5 (1984).
39. Tokinaga D., Kobayashi T., Katori A., Karasawa Y. Urease immobilised urea electrode and process for preparing the same. U.S. Patent 4, 476, 005, Oct. 9th, 1984. Hitachi Ltd.
40. Tokyo Elec. Enzyme electrode containing immobilised glucose oxidase or uricase with enzyme store for supplementation. JP 224055, 24th June. 1985.
41. Tran N.D., Romette J.L., Thomas D. An enzyme electrode for specific determination of L-lysine. A real time sensor. *Biotech. Bioeng.*, **25**, 329–40 (1983).
42. Tsuchida T., Takasugi H., Yoda K., Takizawa K., Kobayashi S. Application of L-lactate electrode for clinical analysis and monitoring of tissue culture medium—an enzyme electrode for L-lactic acid determination. *Biotechnol. Bioeng.*, **27**, 837–41 (1985).
43. Verduyn C., Van Dijken J.P., Scheffers W.A. A simple sensitive and accurate alcohol electrode. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 1049–55 (1983).
44. Van Haecht J.L., De Breae M., Rouxhet P.G. Immobilization of yeast by adhesion to a support without use of a chemical agent. *Enzym. Microbiol. Technol.*, **6**, 221–7 (1984).
45. Wingard L.B., Cantin L.A., Castner J.F. Effect of enzyme matrix composition on potentiometric response to glucose using glucose oxidase immobilised on Platinum. *Biochim. Biophys. Acta*, **748**, 21–7 (1983).
46. Wingard L.B., Castner J.F., Yao S.J., Wolfson S.K., Drash A.L., Liu C.C. Immobilised glucose oxidase in the potentiometric detection of glucose. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **9**, 95–104 (1984).
47. Wisdom R.A., Dunnill P., Lilly M.D., McCrae A. Enzyme interesterification of fats: factors influencing the choice of support for immobilised lipase. *Enzym. Microbiol. Technol.*, **6**, 443–6 (1984).
48. Wong S.S., Malorie T.E., Lee T.K. Use of Concanavalin A as a Topographical Probe for Protein-Protein interaction. Lactose Synthase. *Biochim. Biophys. Acta*, **745**, 90–6 (1983).

Глава 7

Генная инженерия

П. Дж. Уорнер

7.1. Введение

Предметом обсуждения в этой главе будет то воздействие, которое генетические методы, по-видимому, оказали на сенсорную технологию. В семидесятых годах, т. е. в течение последних десяти лет, в генетике было сделано четыре революционных открытия: рестрикция ДНК эндонуклеазами, обнаружение плазмид (первоначально в бактериях), гибридизация нуклеиновых кислот, методы определения нуклеотидной последовательности ДНК. Благодаря этим открытиям стало возможным трансфицировать в различные организмы, обычно бактериальные клетки, гены разного происхождения и затем экспрессировать их. Современное состояние техники получения рекомбинантных ДНК кратко описано ниже.

Можно ли применять эту технику для создания биосенсоров? Цель этой главы как раз и состоит в том, чтобы ответить на этот вопрос, иллюстрируя это соответствующими примерами.

С помощью рекомбинантной техники можно улучшить биологические компоненты биосенсоров на основе ферментов и цельных клеток. При этом не только улучшатся аналитические характеристики биосенсоров, например путем оптимизации входящих в них ферментов, но и расширится область их применения. Описываемая техника поможет также в создании более доступных источников ферментов, которые в настоящее время трудно получать в достаточном количестве, что позволит снизить стоимость биосенсоров.

7.2. Техника получения рекомбинантных ДНК

Детальное рассмотрение методов генной инженерии выходит за рамки этой книги, и здесь они рассмотрены лишь вкратце. Полное представление об этих методах читатель может получить из превосходной монографии [14].

7.2.1. Молекулярное клонирование

На рис. 7.1 приведена схема типичного эксперимента по клонированию молекул ДНК. Первый этап — это выделение в чистом виде нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющую интерес функцию, из ее природного хозяина. Из бактерий и других прокариотов необходимую ДНК часто можно выделить непосредственно. Для высших растений и животных процедура выделения несколько отлична, поскольку их ДНК включает последовательности, известные как интроны. Интроны представляют собой имеющиеся в генах нуклеотидные последовательности, исключаемые из матричной РНК (этот процесс называют сплайсингом) в промежутке между транскрипцией и трансляцией (рис. 7.2). Чтобы интересующий нас ген мог быть экспрессирован в прокариотах, интроны необходимо исключить (рис. 7.3). С этой целью сначала

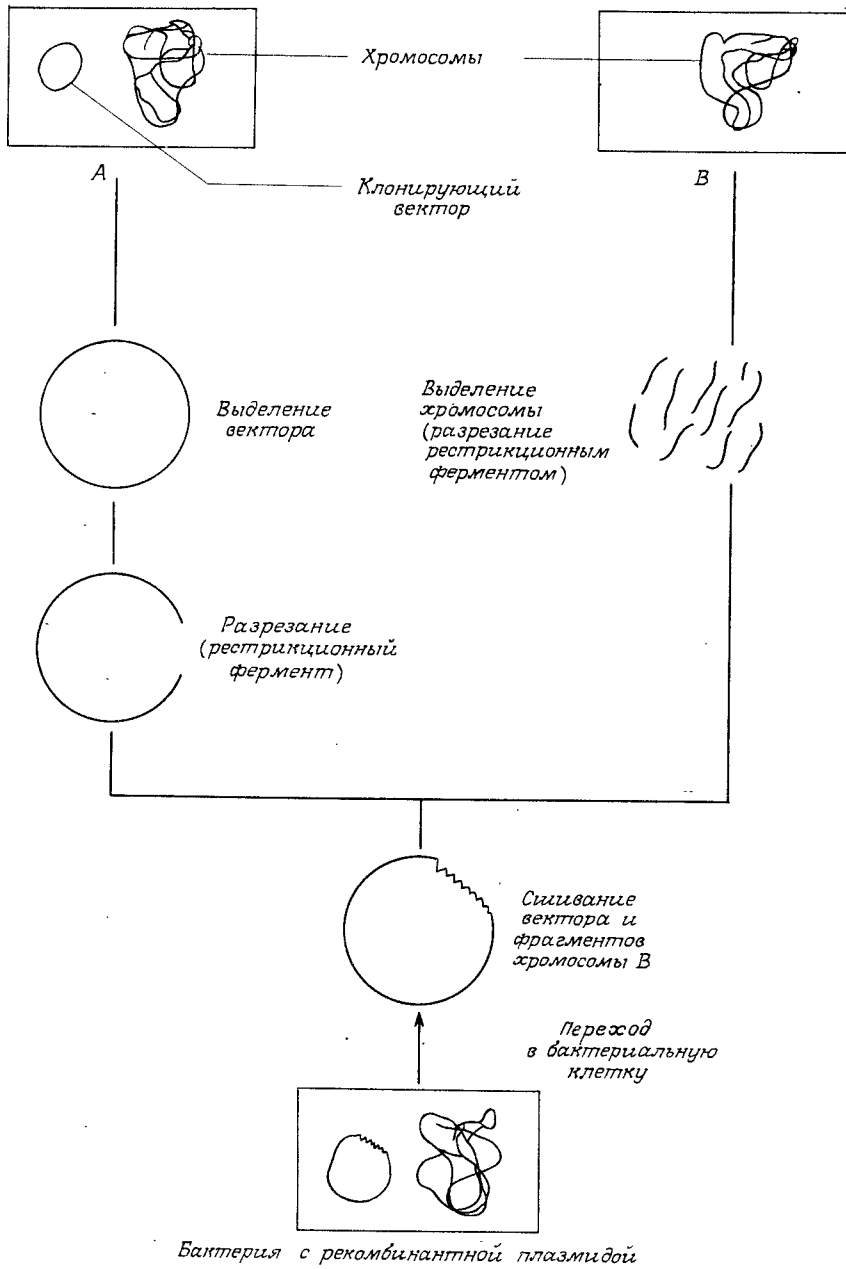
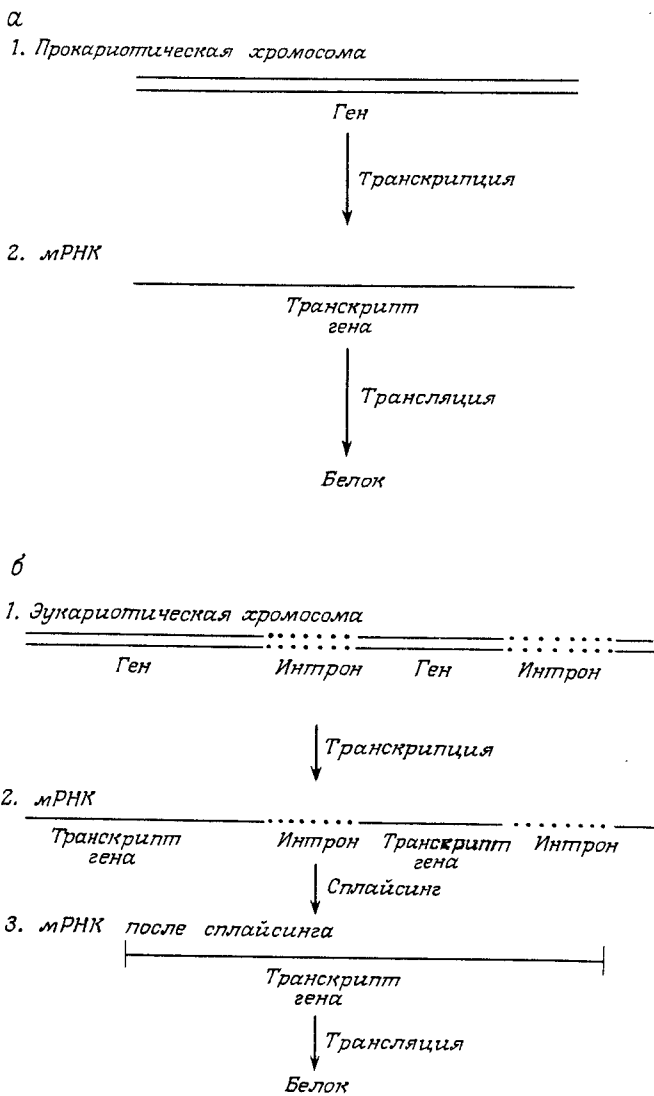


Рис. 7.1. Пример клонирования ДНК, показывающий роль клонирующего вектора.

Рис. 7.2. Перенос генетической информации в прокариотах (а) и эукариотах (б). В первом случае ДНК транскрибируется в матричную РНК (мРНК), которая затем транслируется с образованием белка. В эукариотах гены содержат прерывающиеся последовательности (интроны), которые точно транскрибируются. Части самих генов называют экзонами. Перед транскрипцией интроны удаляются из мРНК. Поэтому при клонировании ДНК непосредственно в прокариотах интроны не распознаются и остаются в мРНК при трансляции, не позволяя получить активный белок. Эта проблема решается с помощью методики, иллюстрируемой рис. 7.3.



выделяют матричную РНК (мРНК), используя клетки, в которых, вероятно, имеется ген, представляющий интерес для индукции. В таких клетках количество изучаемой мРНК составляет существенную долю от всего имеющегося количества РНК. Из эукариотов матричную РНК выделить довольно легко, поскольку, в отличие от других типов РНК, ее концевые части состоят из полиадениновых (полиА) цепей, которые связываются с полимином (полиТ) в соответствующей аффинной колонке. Изолированную мРНК подвергают обратной транскрипции *in vitro*, используя вирусный фермент обратную транскриптазу. В результате получается так называемая комплементарная ДНК (кДНК), не содержащая интронов.

Фрагмент ДНК, который предполагается экспрессировать в бактерии, получают с помощью следующей процедуры. ДНК разрезают на части, используя рестрикционные

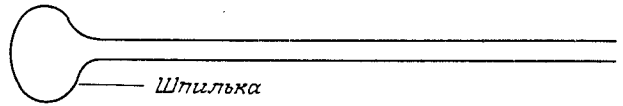
Рис. 7.3. Клонирование эукариотической ДНК. Сначала выделяют матричную РНК, кодирующую требуемый продукт, поскольку она не содержит интронов (рис. 7.2). Затем ее обрабатывают вирусным ферментом обратной транскриптазой, которая генерирует последовательность ДНК, не содержащую интронов. Обычно получается двухцепочечная ДНК со шпилькой на одном конце, которую удаляют ферментом нуклеазой S1, специфически разрезающей шпильку. В результате получается комплементарная ДНК (кДНК), пригодная для клонирования в «хозяине»-прокариоте (бактерии).

1. Изолированная после сплайсинга мРНК

Ген, не содержащий интронов

Обратная транскриптаза

2. Двухцепочечная ДНК



Нуклеаза S1

3. Двухцепочечная ДНК (кДНК)

эндонуклеазы [11]. Эти ферменты разрезают ДНК всюду, где находятся определенные специфические нуклеотидные последовательности, оставляя на концах каждого фрагмента короткие шпильки. Аналогичной обработке подвергают плазмиду – небольшой автономно реплицирующийся участок бактериальной ДНК. Затем оба фрагмента ДНК разного происхождения объединяют, используя фермент, называемый ДНК-лигазой. Далее рекомбинированную ДНК вводят в бактерию. Обычно это достигается путем генетической трансформации, в ходе которой при определенных условиях голая ДНК проникает в бактерию и затем реплицируется. Таким образом теперь мы имеем рекомбинантную молекулу, существующую в новом хозяине. Плазмиды, используемые как клонирующие векторы, содержат специальные генетические маркеры, например гены устойчивости к определенным антибиотикам, и, таким образом, после трансформации содержащие плазмиды клетки могут быть отобраны селекцией. Если чужеродные ДНК внедряются в середину одного из маркерных генов, рекомбинанты его утратят; такие рекомбинантные микроорганизмы, очевидно, чувствительны к маркерному антибиотику, что можно использовать для их выявления. Процедура, называемая вставочной инактивацией, иллюстрируется рис. 7.4. «Чужеродные гены» либо экспрессируются, либо не экспрессируются; это значит, что бактерия может проявлять признаки, кодируемые клонированными генами, но может и не проявлять их. В последнем случае представляющие интерес гены можно переклонировать в плазмиды, специально сконструированные так, чтобы облегчить экспрессии клонируемых генов. Вместо бактериальной плазмиды в качестве клонирующего вектора можно использовать некоторые бактериофаги (бактериальные вирусы). На рис. 7.5 показан

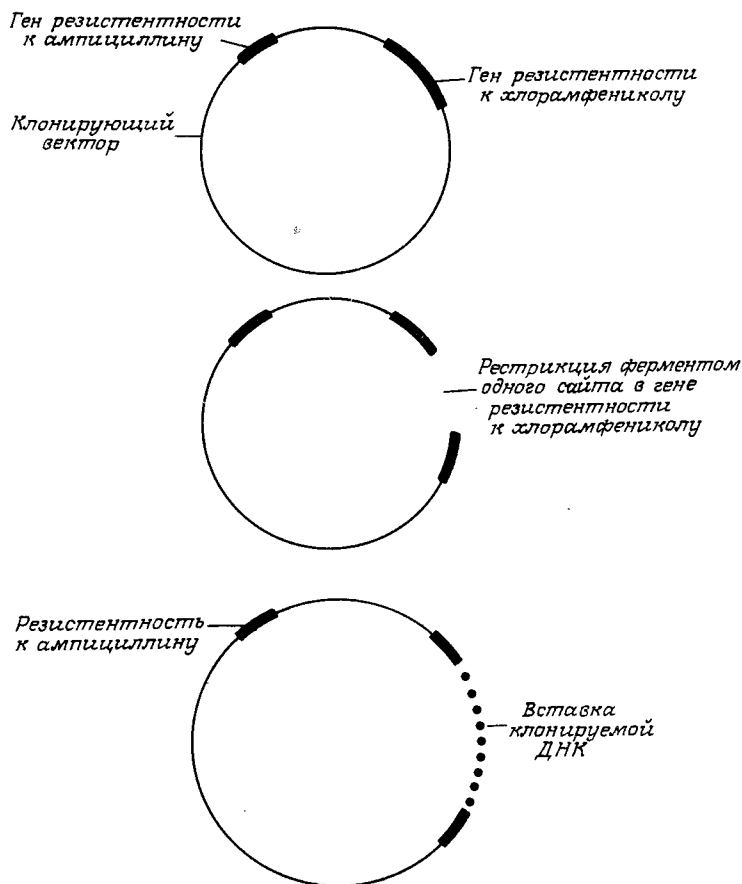


Рис. 7.4. Использование вставочной инактивации для идентификации рекомбинантных молекул. В плазмиде в гене резистентности к хлорамфениколу имеется единственный сайт для определенного рестрикционного фермента. Именно сюда вставляется чужеродная ДНК. Микроорганизмы, которые приобрели такие рекомбинантные ДНК, легко распознаются, поскольку они чувствительны к хлорамфениколу (вставка нарушает структурную целостность гена резистентности к хлорамфениколу), но остаются резистентными к ампициллину.

жизненный цикл бактериофага лямбда *Escherichia coli*, который является лучшим из известных фаговых клонирующих векторов. На его основе разработано много других клонирующих векторов [5]. Техника клонирования с помощью фаговых векторов аналогична клонированию с использованием плазмид. Однако при этом рекомбинанты выделяют в виде бактериофаговых бляшек, а не интактных бактериальных клеток. Бляшки представляют собой круглые прозрачные клетки в зоне роста бактерий на пластинке, возникающие в результате инфекции фагом хотя бы одной бактерией. Фаг лизует бактерию, при этом образуется несколько тысяч его копий, которые затем инфицируют окружающие клетки. Пока наилучшей системой для клонирования ДНК является *E. coli*, но аналогичные системы разрабатываются и для ряда других бактерий, как грам-положительных, так и грам-отрицательных. Сюда входят *Pseudomonas*,

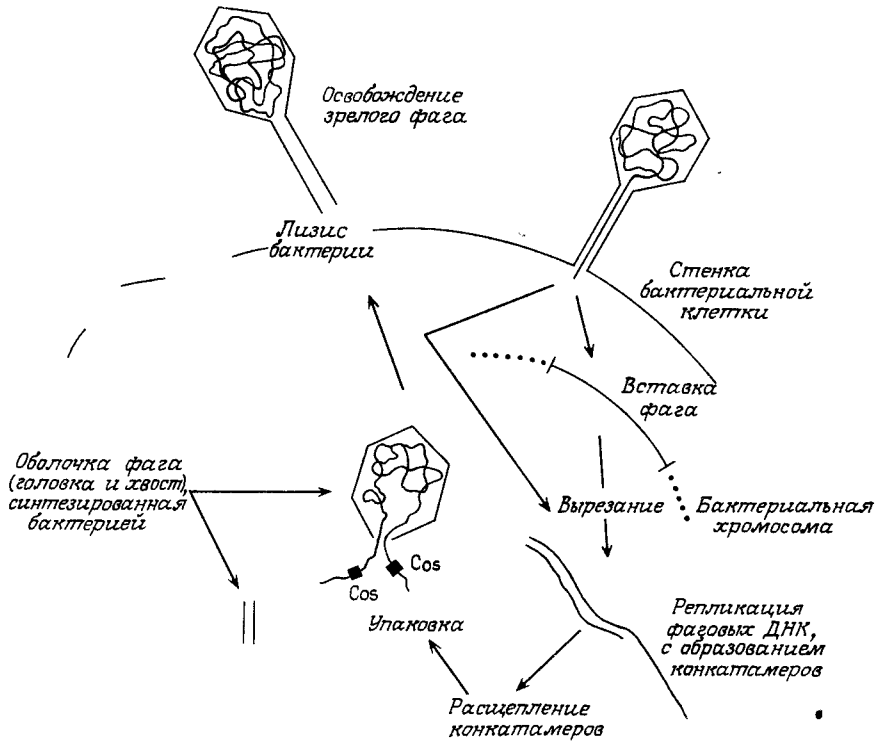


Рис. 7.5. Жизненный цикл бактериофага Лямбда. Внедрившись в бактерию-хозяина, фаг может либо войти в литический цикл, либо включиться в бактериальную хромосому, с которой он подвергается репликации (лизогенное состояние). В дальнейшем на некотором этапе фаг может опять стать литическим – этот процесс можно инициировать УФ-облучением лизогенов. Литический цикл – это вегетативный процесс, в конце которого клетка-хозяин лизирует, освобождая большое число фагов. За упаковку реплицированной ДНК в оболочку фага ответственны "cos"-сайты.

Bacillus и *Streptomyces*. Описанная выше техника клонирования пригодна и для дрожжей. Аналогичные эксперименты становятся возможными и с клетками высших животных и растений.

7.2.2. Гибридизация нуклеиновых кислот

Этот вопрос здесь детально не обсуждается, поскольку он уже рассматривался в гл. 5. Напомним только, что гибридизация позволяет установить сходство двух фрагментов ДНК (блотинг по Саузерну [16]) или фрагментов РНК и ДНК (нозерн-блотинг [1]). Связь этого метода с предметом обсуждения данной главы рассматривается ниже.

7.2.3. Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Определение нуклеотидной последовательности, или секвенирование ДНК, стало возможным лишь в последние годы. К 1977 г. было разработано два метода секвенирования ДНК: химический метод Максама и Гилберта [12] и метод Сэнгера [15],

основанный на ингибировании полимеразной реакции, что приводит к прерыванию синтеза ДНК в определенных точках.

7.2.3.1. Метод Максама и Гилберта. В этом методе используют определенный фрагмент ДНК, получаемый расщеплением ДНК рестрикционной эндонуклеазой. На одном конце нуклеотидной цепи вводят метку ^{32}P . Далее исследуемый фрагмент обрабатывают реагентами, которые модифицируют одно из четырех имеющихся в ДНК оснований так, что с помощью некоторых химических реагентов (табл. 7.1) его можно удалить. При этом цепь расщепляется на фрагменты различной длины, меченные с одного конца. Длину этих вторичных фрагментов определяют с помощью гель-электрофореза высокого разрешения. Детально реакции, используемые для секвенирования ДНК, описаны в табл. 7.1.

Таблица 7.1. Реагенты, используемые для секвенирования ДНК методом Максама и Гилберта

Основание	Реагент, модифицирующий основание	Реагент, удаляющий модифицированное основание	Реагент, расщепляющий нуклеотидную цепь
Гуанин	Диметилсульфат	Пиперидин	Пиперидин
Гуанин + аденин	Кислота	Катализируемое кислотой депурирование	»
Тимин + цитозин	Гидразин	Пиперидин	»
Цитозин	Гидразин + NaCl	»	»
Аденин + цитозин	NaOH	Пиперидин	Пиперидин

7.2.3.2. Секвенирование ДНК по Сэнгеру. Это наиболее употребительный метод секвенирования ДНК, поскольку по сравнению с химическим методом он позволяет анализировать более крупные фрагменты ДНК с меньшей вероятностью ошибки. Секвенируемую ДНК сначала клонируют в одноцепочечный бактериофаговый вектор, который может функционировать в *E. coli*. Чаще всего используют фаг M13 и его производные [13]. Одноцепочечная ДНК взаимодействует как субстрат с ДНК-полимеразой, которая точно копирует первую цепь. Однако если нормальный дезокси-нуклеозидфосфат заменить его аналогом – дидезоксинуклеозидфосфатом, то дальнейшее функционирование полимеразы прекращается и рост синтезируемой цепи останавливается. Для иницирования этого процесса используют химически синтезированный универсальный нуклеотидный праймер. Реакцию проводят в присутствии четырех аналогов dNTP, один из которых содержит метку ^{32}P . Исходно имеется четыре реакционные смеси, в каждой из которых понижена концентрация одного из аналогов меченого нуклеотида. Поэтому в результате реакции получаются смеси меченных радионуклидами фрагментов ДНК, один конец у которых одинаков, но при этом они имеют разную длину и разные основания на другом конце. После инкубации ДНК в каждой смеси превращается в одноцепочечную форму. Затем смеси подвергают электрофорезу в полиакриламидном геле. Длину и последовательность фрагментов ДНК можно считать непосредственно с гелевого слоя. Этот метод позволяет секвенировать в одной серии реакции от 250 до 500 пар оснований. Полученные данные часто анализируют с помощью компьютера.

7.2.4. Сайт-специфический мутагенез

После определения нуклеотидной последовательности представляющей интерес части ДНК с помощью разработанной сейчас специальной методики в нее можно

внести сайт-специфические изменения, что позволяет исследовать влияние замены определенных аминокислот в белке, кодируемом ДНК [6, 18]. Эту методику называют сайт-специфическим мутагенезом. Субстратом, как и в предыдущем случае, служит одноцепочечная ДНК, а праймером – синтетический олигонуклеотид, в котором изменена одна пара оснований и который, следовательно, обладает специфическим мутагенным эффектом. Для получения двухцепочечной ДНК используют ДНК-полимеразу. Полученную таким способом молекулу (плазмиду) с двумя несколько отличающимися цепями трансфецируют в бактерию-хозяина. В некоторых случаях мутантные клоны можно отобрать по фенотипу, но обычно их выявляют по способности к гибридизации с синтетическими олигонуклеотидами. Эта методика лежит в основе ДНК-опосредованной белковой инженерии; более подробно этот метод рассмотрен в гл. 8.

Выше мы попытались дать краткий обзор некоторых методов геной инженерии, которые могут быть использованы для разработки биосенсоров. Теперь обсудим, каких преимуществ можно ожидать от использования данных методов.

7.3. Применение геной инженерии в сенсорной технологии

7.3.1. Увеличение выхода фермента

Одно из очевидных применений техники рекомбинантной ДНК касается случаев, когда используемый в биосенсоре фермент имеется в малых количествах или его трудно выделить. В нашей лаборатории столкнулись с такой проблемой, когда потребовалось получить чистую глюкозодегидрогеназу (GDH) [9]. Этот фермент в принципе можно использовать в глюкозном сенсоре. Такой сенсор обладал бы большей чувствительностью, чем глюкозные сенсоры на основе глюкозооксидазы (GOD), и в отличие от последних не требовал бы кислорода [8, 17]. В наших исследованиях источником GDH служили бактерии *Acinetobacter calcoaceticus*. Выход фермента из этих микроорганизмов, однако, невысок [2], поскольку его содержание, видимо, очень мало. Роль фермента в организме бактерии неясна, но, вероятно, он имеет отношение к энергетическому метаболизму. Глюкозодегидрогеназа состоит из апофермента и кофактора PQQ, который служит кофактором и для нескольких других дегидрогеназ в различных организмах. Можно было бы ожидать, что молекулярное клонирование генов, кодирующих апофермент, и их экспрессия в другом микроорганизме, например *E. coli*, облегчит выделение GDH. Существуют три способа улучшить технологию получения фермента:

1. Кодированный ген можно клонировать в мультикопийные плазмидные векторы. Тогда клетка может содержать до 50 копий таких плазмид, следовательно, представляющий интерес ген будет присутствовать в ней в большом числе копий и может произвести большее количество требуемого продукта.

2. Представляющий интерес ген может быть введен в плазмиду так, чтобы он находился вблизи сильного промотора (для данного организма-хозяина). Промотор представляет собой сайт ДНК, ответственный за трансляцию белка на матричной РНК в рибосоме. Поэтому использование так называемого экспрессированного вектора данного типа делает транскрипцию и трансляцию более эффективными, тем самым приводя к увеличению производства белка. Сконструирован ряд плазмид, которые содержат сайты рестрикционных ферментов, что позволяет вставлять чужеродную ДНК в непосредственной близости от эффективного промотора.

3. Для некоторых систем созданы плазмиды, известные как секретирующие векторы. Такие плазмиды производят клонируемый ген, который секретируется в культуральную среду. Это обеспечивает очевидные преимущества при выделении и очистке фермента.

Найдено, что кофактор PQQ связывается с несколькими ферментами, в том числе метанолдегидрогеназой, способствующей окислению метанола в метилотрофных бактериях [10]. Выделить метанолдегидрогеназу из этих микроорганизмов нетрудно, следовательно, и получение кофактора не является проблемой. Более того, показано, что при объединении PQQ из других источников с апоферментом GDH получается активный холофермент. Поэтому в данном случае необходимо клонировать только ген, который кодирует апофермент.

Выше в качестве примера мы использовали фермент из прокариотического организма. Описанная методика, однако, имеет особое значение для сенсоров на основе ферментов из высших животных и растений. Производство таких ферментов часто является дорогостоящим, поскольку их концентрация в клетках мала и, кроме того, выращивание клеток высших организмов в лабораторных культурах – процесс довольно медленный и связан со значительными техническими трудностями.

7.3.2. Улучшение свойств ферментов

Вторая область приложения молекулярной биологии в сенсорной технике связана с современными методами мутагенеза, используемыми для ферментной инженерии (см. гл. 8). Эти методы позволяют изменить активный центр фермента с тем, чтобы увеличить число оборотов для определенного субстрата. Таким путем можно также сузить или расширить диапазон субстратов данного фермента. При этом фермент может стать более пригодным для решения задачи, стоящей перед исследователем. Предварительным условием проведения подобной работы является знание третичной структуры фермента, обычно определяемой с помощью рентгеновской кристаллографии. Это необходимо, чтобы определить, какая область белка формирует активный центр. После этого в ДНК можно заменить соответствующую пару оснований, что приведет к замене определенного аминокислотного остатка в белковой цепи. Первой стадией в этой процедуре может быть введение представляющего интерес гена в небольшую плазмиду и клонирование его в *E. coli*. Далее, используя описанную выше методику, можно определить нуклеотидную последовательность гена, произвести в ней замену соответствующей пары оснований. Затем прослеживают влияние этой замены на свойства фермента. Этот метод применим к почти любому ферменту, если имеется достаточно информации о его третичной структуре.

7.3.3. Генетическое манипулирование целыми организмами, используемыми в сенсорах

В тех случаях, когда применение бесклеточных ферментных сенсоров затруднено, используют сенсоры на основе целых микроорганизмов. Примером может служить рассмотренный в гл. 2 метановый сенсор на основе метанотрофных бактерий. В этом сенсоре биокатализатором является метанмонооксигеназа, которая способствует окислению метана в метанол [7]. Использовать данный фермент в бесклеточной системе почти невозможно, так как трудно получить чистый и устойчивый препарат фермента *in vitro*, и, кроме того, для поддержания его активности необходимы другие компоненты бактериальной клетки. К их числу относятся кофакторы и продукты метаболизма клетки-хозяина, восстанавливающие фермент. Предпринимались попытки восстанавливать фермент электрохимически, однако скорое решение этой проблемы маловероятно. Альтернатива же состоит в использовании иммобилизованных целых микроорганизмов вместо очищенного фермента. Такие микроорганизмы в принципе могут быть улучшены генетическим манипулированием, о чем свидетельствуют следующие примеры. Содержание в клетке фермента, необходимого для сенсора, может быть увеличено настолько, что он будет составлять большую часть клеточного белка.

Генная инженерия позволяет также создавать микроорганизмы с повышенным потреблением субстрата (так легче приводить его в контакт с ферментом) и тем самым улучшить параметры отклика и чувствительность сенсора. Можно также изменить локализацию в клетке представляющего интерес фермента. Так, если в бактерии локализовать его в периплазматическом пространстве, это также облегчит доступ субстрата. Наконец, можно модифицировать гены, кодирующие стенку используемых микроорганизмов, чтобы последние легче было прикреплять к поверхности сенсора или чтобы улучшился перенос электрона к ней. Эта идея представляется несколько умозрительной, поскольку пока что трудно представить, какие именно генетические изменения необходимы для достижения желаемого эффекта. Как и в белковой инженерии, такое применение генной инженерии предполагает предварительное знание физиологии и генетики конкретного микроорганизма, следовательно, для этих целей наиболее пригодны хорошо охарактеризованные виды микроорганизмов, в том числе те, в которые с помощью генной инженерии вводят и экспрессируют интересующие исследователей гены.

7.4. Выводы

Нет сомнений в том, что генная инженерия будет играть определенную роль в развитии биосенсоров, как и во многих других областях биотехнологии. Необходимость коммерческого выпуска этих устройств уже осознана. Однако биосенсоры с улучшенными с помощью генетических манипуляций характеристиками, видимо, появятся лишь в сенсорных системах второго поколения. Финансирование этих исследований будет проводиться за счет прибыли от тех приборов, которые вскоре появятся на рынке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adams S. L., Alwine J. C., De Crombughe B., Postan I. Use of recombinant plasmids to characterize collage RNAs in normal and transformed chick embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **254**, 4935–8 (1979).
2. Ameyama M., Shinagawa E., Matsushita K., Adachi O. D-Glucose dehydrogenase of *Gluconobacter suboxydans*. Solubilisation, purification and characterization. *Agricultural and Biological Chemistry*, **45**, 851–61 (1981).
3. Barth P. T. RP4 and R300B as wide host range plasmid cloning vehicles. In *Plasmids of medical, environmental, and commercial importance* (eds. K. N. Timmis, A. Puhler). Elsevier, North Holland, 1979.
4. Bolivar F. Molecular cloning vectors derived from the Col E1 type prasmid, pMB1. *Life Sciences*, **25**, 807–17 (1979).
5. Brammar W. J. Vectors based on bacteriophage lambda. In *Genetic Engineering* (ed. R. Williamson), vol. 3, 53–80. Academic Press, New York, 1982.
6. Daibadie-McFarland G., Gohen L. W., Riggs A. D., Morin C., Itakura K., Richards J. H. Oligonucleotide-directed mutagenesis as a general and powerful method for studies of protein functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6409–13 (1982).
7. Dalton H., Prior S. D., Leak D. J., Stanley S. H. Regulation and Control of Methane Monooxygenase. In *Microbial growth on C₁ compounds* (eds. R. L. Crawford, R. S. Hanson), pp. 75–82. ASM, Washington, 1984.
8. D'Costa E. J., Higgins I. J., Turner A. P. F. Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor. *Biosensors* (accepted), **2** (1986).
9. Duine J. A., Frank J. Methanol dehydrogenase: A quinoprotein. In *Microbial growth on C₁ compounds* (ed. H. Dalton), pp. 31–41. Heyden, London, 1981.
10. Duine J. A., Frank J., Van der Meer R. Different forms of quinoprotein aldolase-(glucose-)dehydrogenase. *Archives of Microbiology*, **31**, 27–31 (1982).
11. Kessler C., Neumaier T. S., Wolf W. Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases—a review. *Gene*, **33**, 1–102 (1985).
12. Maxam A. M., Gilbert W. Sequencing end-labelled DNA with base specific chemical cleavages. In

- Nucleic acids, Part 1. Methods in Enzymology 65 (eds. L. Grosman, K. Moldave), pp. 499–560. Acad. Press, New York, 1980.
13. *Messing J., Vieira J.* A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double digest restriction fragments. *Gene*, **19**, 269–76 (1982).
 14. *Old R. W., Primrose S. B.* Principles of genetic engineering (3rd edn). Blackwell Scientific, Oxford, 1985.
 15. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R.* DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463–7 (1977).
 16. *Southern E. M.* Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503–17 (1975).
 17. *Turner A. P. F., Pickup J. C.* Diabetes mellitus: Biosensors for research and management. *Biosensors*, **1**, 85–115 (1985).
 18. *Zoller M. J., Smith M.* Oligonucleotide directed mutagenesis using M13 derived vectors: An efficient and general procedure for the production of point mutations in any fragments of DNA. *Nucl. Acids Research*, **10**, 6487–500 (1982).

Глава 8

Белковая инженерия и ее возможные приложения в биосенсорах

Энтони Э. Г. Касс, Энда Кенни

8.1. Введение

Эта глава посвящена возможным приложениям белковой инженерии в биосенсорах. Белковая инженерия, рассматриваемая здесь в широком смысле, направлена на модификацию ковалентной структуры белка путем добавления, замены или исключения отдельных групп, в результате чего химические свойства белковой молекулы становятся отличными от ее природных свойств. Химические свойства белка, включаемые в это определение, могут быть самыми разнообразными – от катализа ферментом совершенно необычных для него реакций вследствие сдвига субстратной специфичности до увеличения времени сохранения биологической активности фермента в определенных условиях.

Механизмы, позволяющие добиться подобных изменений, весьма разнообразны. Можно, например, модифицировать нуклеотидную последовательность ДНК, которая кодирует представляющий интерес белок, чтобы аминокислотная последовательность белка изменилась определенным образом. Можно ввести природный белок в биосенсор так, чтобы его свойства изменились вследствие взаимодействия с другими компонентами прибора. Прежде чем рассмотреть природу изменений, которые могут быть полезны при модификации белков специально для биосенсорных приложений, целесообразно обсудить некоторые свойства белков, влияющих на их функционирование в биосенсоре.

При определении характеристик сенсора важное значение, очевидно, имеют кинетические параметры $k_{\text{кат}}$ и K_M . Загрузка биосенсора ферментом обычно относительно велика и, следовательно, большое значение $k_{\text{кат}}$ (число оборотов фермента) означает, что на самом деле требуются малые количества фермента (миллиграммы). В специфическом, но важном случае мембранных сенсоров при высоком $k_{\text{кат}}$ лимитирующей стадией в работе прибора становится мембранный транспорт и, таким образом, сенсор относительно нечувствителен к количеству или потере активности фермента.

Теперь обратимся к константе Михаэлиса K_M . Она влияет прежде всего на диапазон линейности сигнала. В идеальном случае связь между выходным сигналом и концентрацией определяемого вещества должна быть линейной. В общем виде связь отражается в величине K_M (или кажущейся K_M) фермента. Анализ уравнения Михаэлиса – Ментен показывает, что линейность сохраняется вплоть до концентраций более $0,2 K_M$, хотя важное значение имеют другие факторы, такие как иммобилизация фермента или наличие мембраны. Отношение двух величин $k_{\text{кат}}/K_M$ есть константа специфичности. Желательно, чтобы для определяемого вещества она была значительно выше, чем для других потенциальных субстратов.

Влияние температуры на работу биосенсора часто определяется несколькими различными конкурирующими процессами. Как и в случае любой химической реакции, скорость ферментативной реакции возрастает с увеличением температуры. Таким

образом, отклик сенсора также должен зависеть от температуры, причем величина этого эффекта определяется энергией активации лимитирующей стадии. Ферменты подвергаются также термической инаktivации, и ее скорость зависит от энергии активации разветвления белка и температуры. Наконец, даже если фермент стабилен, сенсор может давать двухфазный сигнал при изменении лимитирующей стадии. Кроме температуры, к денатурации, влекущей потерю активности, может приводить множество других причин; увеличение общей «устойчивости» биологического компонента способствует практическому применению биосенсоров.

Если активность фермента зависит от ионизирующихся групп, то еще одним фактором, влияющим на отклик биосенсора, является рН. Чтобы сенсор был «совместим» с матрицей анализируемой пробы, может потребоваться изменить положение и протяженность оптимального интервала рН. При низких или высоких значениях рН белки также подвергаются денатурации; это может быть особенно важно при анализе пищевых продуктов или напитков, где пробы часто бывают довольно кислыми.

Наконец, при необходимости иммобилизации биологического компонента может оказаться, что аминокислотные остатки, обеспечивающие связь с носителем, важны также и для каталитической активности фермента. Тогда приходится использовать иной метод иммобилизации. Некоторые потенциальные приложения белковой инженерии в области биосенсоров перечислены ниже:

1. Увеличение числа оборотов фермента.
2. Сдвиг или устранение зависимости от рН.
3. Изменение диапазона линейной зависимости отклика сенсора от концентрации субстрата.
4. Повышение стабильности при хранении и функционировании.
5. Снижение восприимчивости к мешающим веществам.
6. Расширение или сужение субстратной специфичности.
7. Изменение потребности в кофакторах.

В настоящей главе дан обзор различных подходов, используемых для модификации белков. Мы начнем с уровня нуклеотидной последовательности ДНК и постепенно продвинемся дальше. Обсуждаемые примеры не связаны с биосенсорами как таковыми. Однако они позволяют проиллюстрировать некоторые результаты, достигнутые в области изменения свойств белков.

С самого начала следует уяснить, что белковая инженерия, т.е. направленная модификация белка, вообще возможна лишь при наличии детальной информации о нем. В идеальном случае предполагается, что третичная структура белка известна с разрешением, достаточным для локализации отдельных аминокислотных остатков. К сожалению, для многих белков, используемых в биосенсорах, такие данные либо вообще отсутствуют, либо их не хватает. Так, мы все еще довольно мало знаем о молекулярной структуре глюкозооксидазы — вероятно, наиболее широко используемого в биосенсорах, легко доступного (причем в весьма чистом виде и в достаточных количествах) фермента. До сих пор не описаны ни его аминокислотная последовательность, ни кристаллическая структура. Кинетические свойства глюкозооксидазы хорошо изучены [4], однако эта информация не опирается ни на какие структурные данные. Недостаток таких сведений означает, что нам часто трудно не только действительно конструировать белковые молекулы, но даже интерпретировать эффекты, вызванные модификацией на эмпирическом уровне.

Имея в виду это предостережение, мы все же полагаем, что инженерия белковых молекул для биосенсорных приложений — предмет достаточно важный для серьезного обсуждения. В конце концов молекулы белков возникли для выполнения определенных биологических функций, а не для того, чтобы служить частями наших приборов. Хотя какие-то биологические свойства и могут использоваться в наших целях, не удивительно, что другие оказываются при этом более или менее чужеродными.

Помня обо всем этом, приступим к обозрению подходов и методов белковой инженерии.

8.2. Модификация на уровне ДНК

С начала 70-х гг., когда было показано, что ДНК можно расщепить на фрагменты и затем снова соединить *in vitro*, рекомбинантные ДНК стали важным инструментом молекулярной биологии [11]. В настоящее время методы генной инженерии позволяют изолировать, размножить и «прочитать» (определить нуклеотидную последовательность) любой нужный ген, принадлежит ли он растению, животному или микроорганизму. Зная нуклеотидную последовательность ДНК представляющего интерес гена, мы можем затем установить аминокислотную последовательность кодируемого им белка. Верно и обратное — для любой требуемой полипептидной цепи можно создать соответствующую нуклеотидную последовательность. Для относительно небольших пептидов в 1981 г. осуществлен химический синтез гена *in vitro* [14]. Таким образом, не существует теоретических препятствий к конструированию генов, кодирующих новые функции. Трудности возникают, если нужно синтезировать длинные полинуклеотиды — с приемлемым выходом, не загрязненные побочными продуктами сходного строения, а также при проектировании полипептидной последовательности, обеспечивающей желаемые функции. Мы еще очень мало знаем о факторах, определяющих упаковку белка. Поэтому сейчас мы ограничиваемся модификацией существующих белков путем замены нуклеотидов в соответствующих областях гена.

Внесение изменений в первичную структуру ДНК, а не белка, имеет ряд преимуществ. Во-первых, поскольку ДНК — это генетический материал, который точно воспроизводится в ходе роста микроорганизмов, его нужно получить лишь один раз. Модификацию самого белка пришлось бы проводить многократно, нарабатывая новые порции. Во-вторых, любое изменение гена приводит к единственному продукту, тогда как при химической модификации белка часто получается смесь веществ. Наконец, генетическими методами в белке можно заменить любую аминокислоту, химической же модификации белка могут препятствовать стерические или кинетические барьеры. Подход, связанный с мутагенезом *in vitro*, заключается в том, чтобы осуществить точечные мутации гена в одном или ограниченном числе сайтов и проследить, как это скажется на соответствующем белке.

Один из методов химического мутагенеза использовали для замены цитозина на тимин. Для этого ДНК обрабатывали бисульфитом натрия, который при подходящих условиях действует лишь на специфический участок ДНК [43]. Созданы также методы, позволяющие воздействовать на относительно специфические участки нуклеотидной последовательности одноцепочечной ДНК и, после ресинтеза, включать неспаривающиеся или «неправильные» основания [44]. Однако в этих методах нельзя точно задать положение точки мутации; таким образом, чтобы найти необходимый белок, требуется скрининг множества мутантов. Обойти эту проблему можно посредством мутагенеза с использованием олигонуклеотидов, что открывает путь к введению в ДНК специфических точечных мутаций.

В 1978 г. было опубликовано две работы [21, 38], показавшие, каким образом с помощью олигонуклеотидов можно осуществлять прецизионные изменения в структуре ДНК. В обеих работах мутациям подвергался геном бактериофага ФХ174. В зрелом вирусе ДНК этого фага находится в одноцепочечной форме, но при инфицировании перед образованием новых фагов превращается в двухцепочечную, или репликативную, форму (RF). Авторы [21, 38] использовали синтетические олигонуклеотиды, комплементарные к вирусной (+) цепи, в качестве праймеров для синтеза *in vitro*

противоположной (—) цепи и получения замкнутой кольцевой RF-молекулы, включающей праймерный олигонуклеотид. Если праймер содержал неспаренное основание, то RF ДНК все еще образовывалась, но тогда ее потомство было двух типов — либо ДНК штамма «дикого-типа», либо ДНК, инициированная неспаренным праймером. Последнюю отбирали скринингом на мутантный ген. Позже этим методом в ФХ174 было введено несколько других мутаций [20].

Применение направленного мутагенеза с использованием олигонуклеотидов было в значительной степени ускорено двумя более поздними усовершенствованиями. Первое из них относится к синтезу олигонуклеотидных праймеров [49]. Были разработаны и запатентованы автоматические, полуавтоматические и ручные методики твердофазного синтеза олигонуклеотидов; рядом химических компаний стали выпускаться защищенные активные прекурсоры, и сейчас получение праймеров стало рутинной процедурой. Второе достижение — стандартизация методологии использования клонирующих векторов, получаемых из бактериофага M13 [60]. Последний, подобно ФХ174, обладает как одноцепочечной, так и двухцепочечной формами ДНК. Таким образом, представляющий интерес ген можно клонировать в RF-, а подвергать мутагенезу в одноцепочечной форме. M13 особенно удобен в этом отношении, так как он был специально разработан как клонирующий вектор для выделения фрагментов ДНК при секвенировании ДНК методом терминации цепи, развитым авторами [40]; кроме того, в нем имеется несколько уникальных клонирующих сайтов [33]. Схема мутагенеза в M13 показана на рис. 8.1.

В работе [54] показано, что используемые при мутагенезе олигонуклеотиды можно использовать и как гибридизационные зонды для отбора мутантной ДНК. Для этого в олигонуклеотид вводят метку радиоактивного ^{32}P . Поскольку олигонуклеотид более гомологичен мутантной, а не нормальной ДНК «дикого типа», он, очевидно, будет сильнее гибридизироваться именно с первой. Мутантные клоны можно затем идентифицировать с помощью автордиографии.

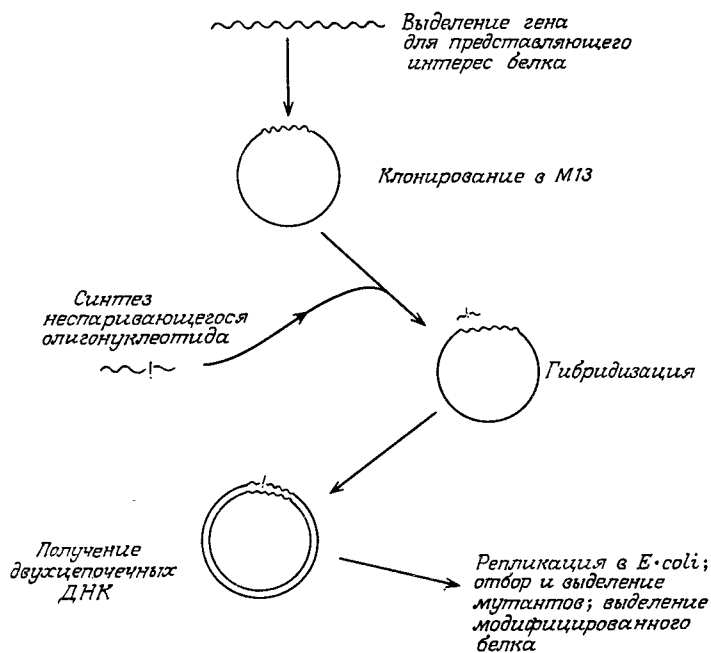
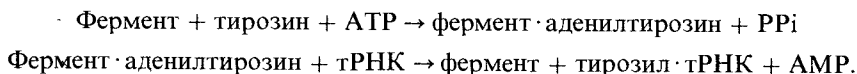


Рис. 8.1. Схема олигонуклеотидного мутагенеза. Показаны основные стадии мутагенеза при использовании бактериофага M13. Подробное описание методики можно найти в работах, цитируемых в тексте.

После идентификации мутантную ДНК можно вырезать из RF, реклонировать в подходящей хозяин/векторной системе для максимального экспрессирования и затем выделить кодируемый ею белок. Многократное повторение этого метода позволяет внести в белок ряд изменений.

С помощью рассмотренного подхода был модифицирован ряд ферментов и изучены свойства мутантов [1]. Одним из наиболее широко изучавшихся примеров является тирозил-тРНК-синтетаза, поскольку ее структура и кинетические свойства хорошо известны [15]. Фермент катализирует реакцию аминацилирования тРНК тирозином, протекающую в две стадии:



Первые результаты [58] показали, что при замене цистеина-35 на серин значение K_M для АТР увеличивается в 4,5 раза. Аналогичная замена на глициновый остаток также приводит к понижению ферментативной активности [56]. Как известно из кристаллографических исследований, цистеин-35 образует водородную связь с рибозным кольцом АТР; таким образом, неудивительно, что введение глицинового остатка приводит к снижению активности. На первый взгляд результаты, полученные с серином, кажутся странными, поскольку можно было бы ожидать, что способность гидроксила к образованию более прочной водородной связи (по сравнению с сульфгидрильной группой) приведет к усилению связывания АТР. Однако в безлигандном ферменте водородные связи образуются с молекулами воды. Разные стерические требования для сульфгидрильной и гидроксигрупп означают, что в мутантном ферменте связывание АТР приводит к замене сильной водородной связи на гораздо более слабую, откуда и следуют наблюдающиеся изменения способности к связыванию АТР и катализу [56].

Введение различных аминокислотных остатков в фермент не обязательно сопровождается потерей каталитической активности. Например, замещение треонина-51 пролином приводит как к уменьшению K_M , так и к увеличению $k_{\text{кат}}$, вследствие чего отношение $k_{\text{кат}}/K_M$ возрастает в 25 раз [57]. Пытаясь понять и предсказать эффекты, связанные с замещением аминокислот в мутантных ферментах, необходимо различать прямое взаимодействие остатка с субстратом и сопутствующие структурные изменения, влияющие на контакты во всей молекуле. Именно к последнему случаю относится описанный выше результат замещения треонинового остатка пролином. Один из подходов, использованных для решения данной проблемы, заключается в изучении двойных мутантов. Если влияние двух мутаций соответствует сумме их индивидуальных вкладов, то роль аминокислотных остатков, вероятно, чисто локальная. И наоборот, любые отклонения от аддитивности предполагают, что роль исследуемых аминокислот шире. Авторы [8] назвали этот эффект «сцеплением». Они показали, что повышение ферментативной активности в случае замены треонина на пролин обусловлено изменением структуры, улучшающим контакт гистидина-48 с АТР. Роль этого взаимодействия была дополнительно проверена путем введения мутаций в позицию 48. При замещении гистидина аспарагином получается фермент той же активности, что и фермент «дикого типа». В то же время введение глутаминового остатка дает значительно менее активный продукт [29]. Этот результат свидетельствует о том, что гистидиновый остаток связан водородной связью через азот и какое-либо электростатическое взаимодействие исключается.

Позже [17] был проведен тонкий структурный анализ мутантных ферментов, полученных заменой треонина-51 на аланин, цистеин или пролин. Детальное кинетическое исследование мутантов показало, что максимальная активность каждого из них зависит от концентрации АТР. Как известно, в тирозил-тРНК-синтетазах из разных

источников аминокислотные остатки в данной позиции различны. Видимо, в ходе эволюции отбирались ферменты, имеющие максимальную активность при определенной внутриклеточной концентрации АТФ.

Недавно сравнение свойств ряда мутантных ферментов использовали [18] для выяснения роли водородных связей в специфичности тирозил-тРНК-синтетазы. Систематически варьируя аминокислотные остатки, авторы смогли установить вклад водородных связей в связывание АТФ и тирозина и специфичность фермента к этим субстратам. Они заключили, что удаление остатка, образующего водородную связь с незаряженной группой субстрата, приводит к снижению энергии связывания последнего лишь на 2–6 кДж/моль; если же водородная связь образуется с заряженной группой, наблюдается значительно больший эффект, до 16 кДж/моль. В недавней работе [55] показано, что водородные связи играют важную роль и в преимущественном связывании субстрата в переходном, а не в основном состоянии.

Хотя в большинстве случаев мутации в этом ферменте подвергали активный центр, изучалось также взаимодействие субъединиц фермента. Нативная тирозил-тРНК-синтетаза – это гомодимер, в котором экспонируется половина реакционных центров. Судя по кристаллической структуре фермента, важную роль в контакте его субъединиц играет фенилаланин-164. Если этот остаток заменить аспаратом, то, согласно данным о стационарной кинетике, титровании активного центра и равновесном связывании, при высоких рН и низкой концентрации фермента в отсутствие тирозина или АТФ как лигандов димер диссоциирует [22]. Авторы полагают, что диссоциация индуцируется именно ионизацией аспарата, тогда как лиганды заметно связываются лишь с димером. тРНК не влияет на равновесие мономер/димер, что заставляет предположить отсутствие предпочтительного связывания с любой формой.

Фермент β -лактамаза катализирует гидролиз пенициллинов и служит основой ряда сенсоров, чувствительных к β -лактамовым антибиотикам. Ген этого фермента обычно служит маркером в векторе pBR322 [3]. В работе [13] использовали дважды неспаренный олигонуклеотид для инвертирования дипептида серин/треонин в активном центре фермента, что привело к потере его активности. При замене в активном центре серина на цистеин мутантный фермент еще проявляет активность, хотя и более низкую, чем нормальный фермент, и чувствителен к ингибированию сульфгидрильными реагентами [45]. Однако тиолактамаза имеет несколько лучшие свойства, чем нативный фермент. Она более устойчива к трипсину и не ингибируется борной кислотой [46].

Важной задачей белковой инженерии является увеличение температурной устойчивости. Один из подходов к решению этой задачи – введение внутримолекулярных сшивок. Его пытались использовать для дигидрофолатредуктазы и T4-лизозима. Судя по предварительным результатам, дисульфидные мостики в обоих этих белках могут подвергаться мутациям. В случае дигидрофолатредуктазы пролин-39 заменяли цистеином. По-видимому, между этим остатком и цистеином-85 образуется дисульфидный мостик, в результате чего активность фермента зависит от его окислительного состояния [53]. В T4-лизосоме изолейцин-3 заменили на цистеин. Картирование пептидов белка показало, что вновь введенный остаток образует дисульфидную связь с цистеином-97. Ни замещение аминокислот, ни образование мостика не отражается на активности фермента, хотя и оказывает влияние на начальную скорость термической денатурации – у мутантного фермента спад активности происходит медленнее, чем у нормального. Интересно, что это различие, видимо, связано не с дисульфидным мостиком как таковым, а с появлением тиольной группы цистеина-54 [36].

Оптимальный интервал рН функционирования фермента можно сдвинуть путем мутагенеза заряженных поверхностных групп, что было показано на примере протеолитического фермента субтилизина. Замещение поверхностного аспарата серином привело к сдвигу связанной с активностью pK_a от 7,17 для нормального фермента до

6,88 для мутантного [50]. Итак, для электростатического эффекта этот сдвиг наблюдается только при низкой ионной силе. Методом олигонуклеотидного мутагеназа недавно была изучена еще одна протеаза – карбоксипептидаза А (СРА). В данном случае целью исследования была проверка предполагаемой роли тирозина-248 в каталитической реакции [19]. При замене этого остатка фенилаланином $k_{кат}$ остается практически той же, но наблюдается повышение K_M (в 6 раз) и особенно (в 70 раз) константы ингибирования ингибитором карбоксиоксидазы А картофеля.

Рассмотренные примеры показывают, что мы уже овладеваем возможностями модификации аминокислотных последовательностей и, следовательно, свойств белков, манипулируя их генами. Несомненно, в настоящее время приложению этого подхода к биосенсорам препятствует недостаток как структурных данных, так и подходящих клонированных генов. Потенциальная мощь геной инженерии наряду с возможностью получения больших количеств материала путем клонирования означает, что в области биосенсоров ее вклад будет столь же велик, как уже велик он во многих других областях биотехнологии (см. также гл. 7).

8.3. Модификация полипептидной цепи

Имеется много реагентов для модификации различных реакционных участков полипептидной цепи. Некоторые из них приведены в табл. 8.1. Химическая модифика-

Таблица 8.1. Типичные примеры химической модификации белков

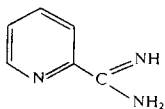
Остаток	Модификаторы
Лизин	Арилирующие агенты, например тринитробензолсульфонат Ангидриды кислот, например малеиновой, янтарной Изомочевины и имидаты
Аргинин	α,β -Дикетоны
Гистидин	Диэтилпирокарбонат
Цистеин	Алкилирующие агенты, например хлоркетоны Алкилирующие агенты, например иодоацетат, N-этилмалеинимид Этилснимин
Тирозин	Тетранитрометан Ацилирующие агенты, например ангидрид уксусной кислоты, ацетилимидазол Иодирующие агенты, например иодид + лактопероксидаза
Глутаминовая и аспарагиновая кислоты	Карбодимиды + амины Диазосоединения

ция имеет важное значение для объяснения структуры и механизма функционирования белков и мечения белка маркерными группами. Соответствующие реагенты селективны в лучшем случае к аминокислотному остатку определенного типа; в благоприятных случаях внешние факторы могут действовать таким образом, что один или два остатка этого типа станут существенно более или менее реакционноспособными, чем остальные. Нацелить реагент на активный центр можно, используя близкий структурный аналог субстрата, несущий модифицирующую группу. Дальнейшее элегантное усовершенствование этого метода заключается в том, что в процессе катализа реакционноспособная группа «обнажается» и, таким образом, получается субстрат-«самоубийца». В большинстве случаев при такой модификации белок полностью утрачивает биологическую активность, так что этот подход меньше всего подходит для

наших нужд при разработке биосенсоров. Существуют, однако, и менее радикальные методы модификации белков, и ниже мы рассмотрим некоторые из них.

8.3.1. Модифицирование с целью повышения активности фермента

Случаи такой модификации, как и можно было ожидать, довольно редки. На первый взгляд может показаться странным, что активность фермента, подвергавшегося эволюции миллионы лет, вообще может быть увеличена. Следует, однако, помнить, что фермент создан для работы в определенной внутриклеточной среде, а в условиях, заметно отличающихся от внутриклеточных, его активность можно повысить. Так, в работе [37] показано, что модификация в алкогольдегидрогеназе лизиновых остатков метилпиколинимидатом приводит к 19-кратному повышению активности фермента



при высокой концентрации субстрата. После модификации кинетические характеристики ферментативной реакции остаются такими же, как у нативного фермента, причем диссоциация кофермента является лимитирующей стадией в обоих направлениях. Именно это является ключом для объяснения наблюдаемых эффектов. Константы Михаэлиса и ингибирования для модифицированного фермента примерно в 15–23, а числа оборотов в 12–30 раз выше, чем для нативной формы. По-видимому, повышенная активность фермента при высокой концентрации субстрата обусловлена увеличением скорости обратных реакций для коферментов. При уменьшении концентрации нативный и модифицированный ферменты по активности сближаются друг с другом.

Еще один пример модифицированного фермента с повышенной активностью – дигидрофолатредуктаза из печени цыпленка, хотя на молекулярном уровне причины такого изменения активности фермента непонятны. Многочисленные реагенты, взаимодействующие с цистеином-11, вызывают 5–10-кратное повышение активности фермента по отношению к физиологическим субстратам NADPH и дигидрофолату ([2] и ссылки в статье). В данном случае, однако, за улучшение приходится расплачиваться значительным понижением термической устойчивости модифицированного фермента. В заключение упомянем повышение АТРазной активности 14S и 30S динеина после модификации аминогрупп тринитробензолсульфонатом [42].

8.3.2. Модификация, вызывающая изменение поверхностных свойств

Рассмотренные в предыдущем разделе примеры, хотя и интересны, а в некоторых случаях поддаются объяснению *post hoc*, не относятся к числу предсказанных наперед и мало полезны при попытке «конструировать» белок определенным образом. Одно из направлений химической модификации, где результат можно предсказать на основе некоторых данных о белке и физико-химических соображений, заключается в изменении поверхностных свойств молекулы. Простейшим с точки зрения и реализации, и интерпретации случаев является изменение поверхностного заряда. На рис. 8.2 приведены типичные реакции, используемые для удаления или обращения заряда. С помощью этих реакций авторы [52] смещали значение pK_a химотрипсина на ± 1 от исходного значения, равного 7. Как и ожидалось, обращение положительного заряда в отрицательный увеличивает pK_a , тогда как замена отрицательного заряда положительным – уменьшает. Сукцинированный химотрипсин характеризуется также повышенным значением $k_{кат}$ и пониженным K_M для гидролиза сложноэфирных субст-

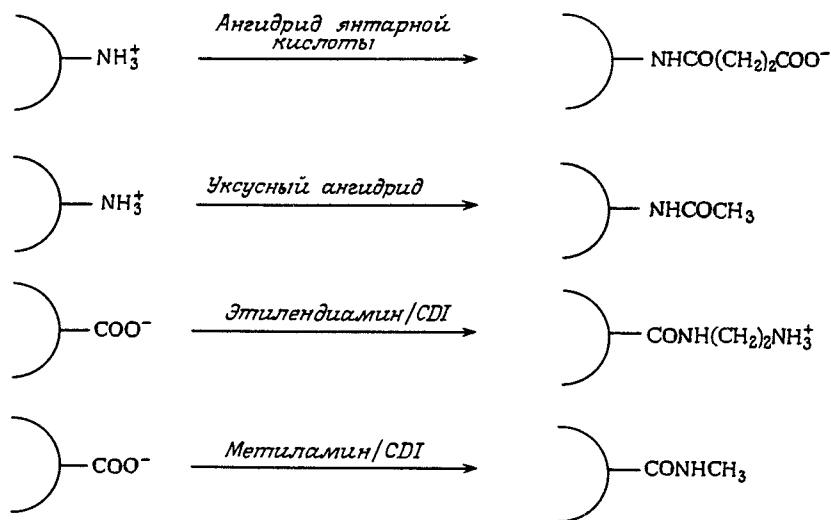


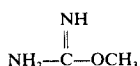
Рис. 8.2. Некоторые типичные реакции, используемые для нейтрализации или обращения заряда поверхностных амино- и карбоксильных групп белков. CDI – водорастворимый карбодимид.

ратов; у фермента, модифицированного этилендиамином, не обнаруживается изменения $k_{\text{кат}}$. В последнем случае K_M сильно зависит от pH, в отличие от нативного фермента, у которого такой зависимости не существует.

Ацетилирование трипсина также привело к повышению активности фермента, несмотря на то, что в этом случае критическим процессом было O-ацетилирование экспонируемого тирозинового остатка [48]. Причиной повышения активности трипсина, по мнению авторов [48], является увеличение скорости образования ацилфермента при гидролизе сложных эфиров и амидов.

Иногда вместо добавления катионов в реакционную среду можно использовать присоединение заряженных групп. Примером может служить пластоцианин. Реакция этого медьсодержащего «голубого белка», переносчика электрона, с $P700^+$ в хлоропласте обычно требует присутствия ионов магния, «экранирующих» отрицательные заряды карбоксильных групп пластоцианина. Авторы [5] смогли достичь того же эффекта и, кроме того, сдвинуть потенциал средней точки выше +40 мВ, модифицируя белок этилендиамином.

Даже если при химической модификации поверхностный заряд остается на прежнем уровне, иногда все же можно достичь положительного эффекта. Авторы [12] лизино-вые остатки нескольких белков (химотрипсин, рибонуклеаза, лизоцим, α -лактальбумин, цитохром, карбоангидраза, бычий сывороточный альбумин) превратили в гомоаргининовые, обрабатывая белки O-метилизомочевинной:



Известно, что объемистая гуанидиновая группа занимает гидрофобные области белка с меньшей вероятностью, чем аминогруппа. Поэтому замена последней группы на первую должна стабилизировать структуру белка. Данные о скорости обмена тритием между белком и водой действительно согласуются с предположением о менее гибкой структуре модифицированного белка.

Значительное улучшение термической устойчивости термолизина было достигнуто [51] путем ацетилирования шести-семи аминогрупп лизиновых остатков длинноцепочечными жирными кислотами, содержащими различное число эфирных групп (рис. 8.3). Гидрофобность модифицирующих групп убывает от V к I. Белки, модифицированные группами I, имеют фактически нормальную активность ($> 90\%$ активности нативного фермента) и повышенную термическую стабильность; производные же V нерастворимы в воде.

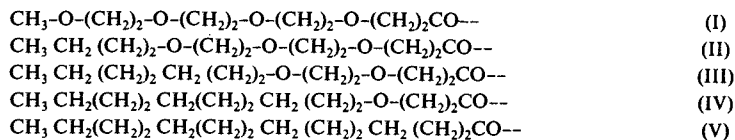


Рис. 8.3. Различные группы, присоединенные к поверхностным лизиновым остаткам термолизина [51]. Гидрофобность модифицирующих групп возрастает от I к V, что обуславливает их различное влияние на термическую устойчивость модифицированного фермента.

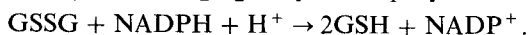
Еще один способ стабилизации белка заключается в связывании его с водорастворимым полимером. Так, связав аденозиндеаминазу с декстраном (активированным цианбромидом), авторы [39] получили продукт, активность которого (при повышенной K_M и снизившейся $k_{\text{кат}}$) составляла всего 13% от активности нативного фермента. Однако при этом увеличилось (с 1 до 2 ч) время снижения активности фермента вдвое при 60°C .

8.3.3. Модификация с изменением специфичности

Изменить субстратную специфичность фермента можно при помощи множества методов; они рассмотрены в недавнем обзоре [24].

Протеазы часто обладают также эстеразной активностью. При ацетилировании в карбоксипептидазе A всего двух тирозиновых остатков наблюдается шестикратное усиление эстеразного действия, протеолитическая же активность фактически утрачивается. Панкреатические рибонуклеазы (РНКазы) подвергали многим химическим модификациям. Интересна димеризация фермента с помощью сшивающего агента диметилсульфуримидата. Нативный фермент представляет собой мономер с низкой активностью по отношению к двухцепочечной РНК, однако после сшивки гидролитическое действие фермента на двухцепочечную РНК усиливается в 78–440 раз. При сшивке этого фермента в присутствии ингибитора индолпропионовой кислоты у него появляется также эстеразная активность, что предположительно связано с осуществлением сшивки при необычной конформации фермента.

Ферменты, катализирующие окислительные реакции, в соответствующих условиях также часто проявляют измененную специфичность. Например, при обработке лизинмонооксигеназы реагентами, взаимодействующими с тиольными группами, можно добиться перехода от монооксигеназных реакций к оксидазным (рис. 8.4). В случае моноаминоксидазы тип реакции остается тем же, но модификация приводит к потере активности по отношению к природному субстрату тирамину и повышению активности к гистамину. При модификации флавопротеиндегидрогеназ их акцепторная специфичность может меняться так, что диапазон соединений, восстанавливаемых этими ферментами, расширяется и, кроме $\text{NAD(P}^+)^+$, включает красители и кислород. Фактически эти ферменты из дегидрогеназ превращаются в оксидазы, как, например, в паре ксантиндегидрогеназа/оксидаза [25]. Глутатионредуктаза катализирует реакцию



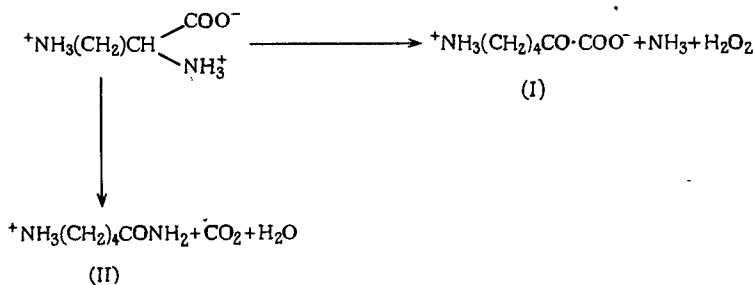


Рис. 8.4. Реакции лизинмонооксигеназы, действующей либо как оксидаза (I), либо как монооксигеназа (II). Реакция II является физиологической, а реакция I индуцируется путем модификации лизиновых остатков в ферменте.

Модификация лизиновых остатков фермента тринитробензолсульфонатом приводит к частичному сохранению NADPH-оксидазной и полной потере глутатионредуктазной активности [6].

8.3.4. Присоединение кофермента

Интересная и потенциально полезная модификация фермента заключается в присоединении к полипептидной цепи кофермента, который обычно свободно диффундирует. Этот способ был описан в работе [30] на примере комбинации аналога NAD и алкогольдегидрогеназы. Полученный в этой работе конъюгат содержал приблизительно одну молекулу кофермента на активный центр, а его активность составляла около 20% активности системы фермент/растворимый кофермент. Во второй публикации тех же авторов [31] показано, что этот конъюгат может быть вовлечен в оборот другой (лактат) дегидрогеназы. Такой подход можно распространить на ADP/ATP-, птерин- и фолат-зависимые системы. При его использовании для функционирования биосенсора не требуется добавления в систему кофермента, что, конечно, является преимуществом.

8.3.5. Новые типы ферментативной активности

Возможность придания белку совершенно нового типа ферментативной активности путем его химической модификации была реализована лишь в немногих случаях. Стратегия модификации здесь заключается в усилении слабой каталитической активности органической молекулы путем ковалентного связывания ее с белковой цепью, чтобы использовать способность последней связывать субстрат. Один из лучших примеров этого рода – флавопапаин [23]. Папаин представляет собой протеазу растительного происхождения, которая содержит каталитически активную тиольную группу. Обработка папаина бромизоаллоксазинами приводит к ковалентному присоединению редокс-групп к тиолу [23], как показано на рис. 8.5. Модифицированный таким образом фермент теперь не проявляет протеолитической активности, но зато проявляет оксидазную. Производное папаина, полученное алкилированием цистеинового остатка активного центра, обладает слабой способностью к окислению дитиолов [18] и дигидроникотинамидов [26, 27]. Окисление дитиолов протекает лишь несколько более быстро по сравнению с самим изоаллоксазином; обычно скорость реакции возрастала в 4–17 раз при значениях $k_{\text{кат}}/K_M$, равных 4–21 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [18]. Анализ молекулярных моделей показал, что при окислении дигидроникотинамида более активным катализатором должно быть другое производное папаина, и это предположение подтвердилось.

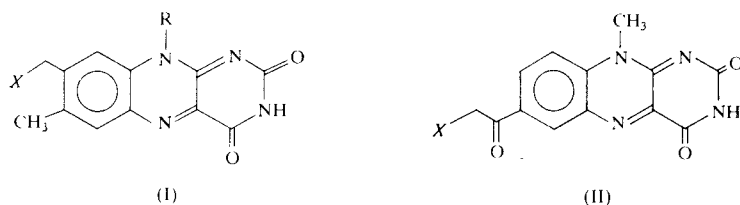


Рис. 8.5. Производные флавина, используемые для синтеза флавиноплапаина ($X = Br-$ или $S-$ папаин). Производное I ($X = S-$ папаин) существенно менее активно, чем II.

По сравнению с не связанной в комплекс группой в присутствии модифицированного папаина скорость окисления возрастает в 4–621 раз, в зависимости от дигидроникотинамида, а для лучшего субстрата отношение $k_{кат}/K_M$ составило $5,7 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, что сравнимо с величиной, характерной для природных флавоферментов [27]. Кроме того, это производное папаина проявляло некоторые типичные свойства ферментов, в том числе кинетику с насыщением и стереохимическую предпочтительность атома водорода 4А при окислении NADH [28].

Модификация активного центра – не единственный способ создания новой ферментативной активности. Авторы [32] метили три поверхностных гистидиновых остатка миоглобина группами пентамминрутения. После модификации у гемового центра появилась способность прочно связывать анионы. Еще интереснее то, что такой гем проявляет также выраженную кислород-зависимую аскорбат- и дуругидрохиноноксидазную активность.

8.3.6. Частичный синтез белков

В настоящее время химический синтез замещенных белков из природных аминокислот вытеснен методом олигонуклеотидного мутагенеза (см. выше). Химические методы применяют, только если требуется замещение необычной аминокислотой. Детально эта область рассматривается в обзоре [9] и книге Оффорда [35].

8.3.7. Модификация иммобилизацией

Иммобилизацию белков на самых разных носителях используют для решения множества химических задач. Этот вопрос подробно рассмотрен в монографиях [10, 34, 59], а также в гл. 6. Аналитические приложения иммобилизации описаны в [7]. Из-за недостатка места мы не можем отдать должное всем работам в этой области. Читателю, желающему получить более детальные сведения, рекомендуем обращаться к упомянутым выше источникам и к оригинальным работам. В этом разделе мы лишь отметим некоторые типичные эффекты, связанные с иммобилизацией.

8.3.7.1. Кажущаяся активность фермента. После иммобилизации кажущаяся активность фермента часто уменьшается. Это может быть обусловлено рядом факторов. Иногда химические процессы, протекающие при иммобилизации, приводят к модификации активного центра, что сказывается на его каталитической функции. Этого можно было ожидать, так как многие аминокислотные остатки, входящие в активный центр, обладают повышенной реакционной способностью, хотя они и могут быть стерически защищены. Если такая инактивация действительно имеет место, то следует либо подыскать другой химический способ связывания фермента с носителем, либо выбрать условия, в которых подавляется реакция на активном центре, например проводя иммобилизацию в присутствии субстрата, продукта или ингибитора.

Даже если иммобилизация непосредственно не влияет на фермент-субстратную реакцию, природа носителя может приводить к возникновению диффузионных барьеров. Так, изучая реакционную способность цитохрома *c*, иммобилизованного на гранулированной агарозе [41], авторы обнаружили, что, хотя потерю активности цитохрома *c* при взаимодействии с обеими оксидазами и, в меньшей мере, редуктазой удалось предотвратить, реагирует лишь цитохром, связанный с поверхностью гранул. Для используемых в качестве субстрата митохондриальных частиц недоступна большая часть цитохрома *c*, находящегося внутри пористых гранул. Аналогичные результаты получены и с иммобилизованными гидролазами: их кажущаяся активность в случае субстратов с небольшими молекулами выше, чем для макромолекул. В общем случае гранулированные носители создают меньше диффузионных ограничений, чем волокнистые, а на плоских поверхностях реакции развиваются быстрее, чем в пористых материалах.

С другой стороны, при некоторых обстоятельствах, особенно в случае сопряженных ферментных систем, иммобилизованный препарат может проявлять более высокую кажущуюся активность, чем в растворе. При совместной иммобилизации создаются условия для направленного потока субстрата, в результате чего сокращается его диффузионный путь между ферментами, иными словами, более высокая локальная концентрация промежуточного продукта приводит к увеличению кажущейся активности.

Таким образом, чтобы оптимизировать активность и время отклика системы, необходимы тщательный выбор носителя и химического способа иммобилизации. Последний также должен быть совместим с конечной конфигурацией и технологией изготовления биосенсора. Наконец, даже если выбраны подходящие носитель и реакции, используемые для иммобилизации, сама иммобилизация может вызывать уменьшение конформационной подвижности и, следовательно, активности белка.

8.3.7.2. Устойчивость. Принято считать, что иммобилизация приводит к повышению устойчивости связанного белка по отношению к физическим и химическим воздействиям. По данным [10], из 50 иммобилизованных ферментов для 60% устойчивость увеличилась, для 16% – понизилась, а для 24% – не изменилась. Следует иметь в виду, что устойчивость к термической денатурации, протеолитическому разложению, экстремальным рН или химической денатурации может отражать совершенно различные аспекты разворачивания белков. Точно так же и устойчивость фермента при его работе и хранении может зависеть от совершенно разных физических и химических процессов. В настоящее время лучшим подходом к повышению устойчивости фермента является эмпирический поиск. Но, чтобы выработать стратегию иммобилизации фермента, может потребоваться детальное выяснение причин потери его активности.

8.3.7.3. Отделение от окружающей среды. Обычно от носителя, на котором проводится иммобилизация, требуется, чтобы он был просто инертной подложкой для активного биологического материала. Можно, однако, представить себе случаи, когда носитель играет более активную роль. В определенных условиях он может обеспечить ферменту микроокружение, отличное от окружения в объеме раствора. Весьма похожий эффект дает обсуждавшаяся выше в этой главе поверхностная модификация белка. Положительно заряженный носитель стремится потерять протоны, так что кажущееся оптимальное для данного фермента значение рН будет ниже обычного. Аналогичным образом гидрофобный субстрат стремится проникнуть в гидрофобный носитель, что приводит к уменьшению кажущейся K_M для этого субстрата. С другой стороны, носитель можно разместить так, чтобы исключить влияние мешающих веществ, присутствующих в анализируемой смеси. Такие эффекты довольно легко предсказывать. Особенно важными они становятся при разработке биосенсоров, удовлетворяющих самым строгим критериям.

В заключение этого раздела, посвященного иммобилизации, мы должны упомянуть иммобилизацию коферментов [34]. Одной из проблем, возникающих при использовании биосенсоров со свободно диффундирующими коферментами, является утечка последних из сенсора. Возможный способ решения этой проблемы – иммобилизация кофермента в растворимой или нерастворимой форме.

8.4. Заключение

В этой главе мы постарались описать всевозможные способы изменения свойств белков, которые могут сделать их более пригодными для использования в биосенсорах. Самым мощным и универсальным методом модификации белков бесспорно является олигонуклеотидный мутагенез. Однако для конкретных ферментов, представляющих практический интерес, информация, необходимая для целенаправленного использования этого метода, обычно неполна либо вообще отсутствует. По правде говоря, до сих пор ни один важный для биосенсоров фермент не был улучшен с помощью олигонуклеотидного мутагенеза. Другой подход к модификации белков заключается в целенаправленном изменении их поверхностных свойств. Такой подход может широко применяться и давать предсказуемые результаты даже в отсутствие кристаллографических данных. Подводя итог, мы можем уверенно предсказать, что инженерия белков для биосенсоров, в настоящее время существенно менее развитая, чем другие направления данной области, будет иметь важное значение для разработки следующего поколения этих приборов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ackers G. K., Smith F. R.* Effects of site specific amino acid modification of protein interaction and biological function. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 597–629 (1985).
2. *Barbehenn E. K., Kaufman B. T.* Alteration of the properties of chicken liver dihydrofolate reductase as a result of modification by tetrathionate. *J. Biol. Chem.*, **255**, 1978–84 (1980).
3. *Bolivar F., Rodriguez R. L., Greene R. J., Betlach M. C., Heyner H. L., Boyer H. W., Crosa J. H., Fal-kow S.* Construction and characterisation of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene*, **2**, 95–113 (1977).
4. *Bright H. J., Porter D. J. T.* Flavoprotein oxidases. *The Enzymes*, XII, 421–511 (1975).
5. *Burkey K. O., Gross E. L.* Chemical modification of spinach plastocyanin: separation and characterization of four different forms. *Biochemistry (USA)*, **21**, 5886–90 (1982).
6. *Carlberg I., Mannervik B.* Oxidative activity of glutathione reductase effected by 2, 4,6-trinitrobenzenesulfonate. *FEBS Lett.*, **115**, 265–8 (1980).
7. *Carr P. W., Bowers L. D.* Immobilised enzymes in analytical and clinical chemistry. Wiley, New York, 1980.
8. *Carter P. J., Winter G., Wilkinson A. J., Fersht A. R.* The use of double mutants to detect structural changes in the active site of the tyrosyl-tRNA synthetase (*Bacillus stearothermophilus*). *Cell*, **38**, 835–40 (1984).
9. *Chaiken I. M.* Semi-synthetic peptides and proteins. *Crit. Rev. Biochem.*, **11**, 255–301 (1981).
10. *Chihata I.* Immobilised enzymes. Wiley, New York, 1978.
11. *Cohen S. N., Chang A. C. Y., Boyer H. W., Helling R. B.* Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **70**, 3240–4 (1973).
12. *Cupo P., El-Deiry W., Whitney P. L., Awad W. M.* Stabilization of proteins by guanidination. *J. Biol. Chem.*, **255**, 10828–33 (1980).
13. *Dalbadie-McFarland G., Cohen L. W., Riggs A. D., Morin D., Itakura K., Richards J. H.* Oligonucleotide-directed mutagenesis as a general and powerful method for studies of protein function. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **79**, 6409–13 (1982).
14. *Edge M. D., Greene A. R., Heathcliffe G. R., Meacock P. A., Schuck W., Scanlon P. B., Atkinson T. C., Newton C. R., Markham A. F.* Total synthesis of a human leukocyte interferon gene. *Nature*, **292**, 756–62 (1981).
15. *Fersht A. R., Shi J. P., Wilkinson A. J., Blow D. M., Carter P., Waye M. M. Y., Winter G. P.* Analysis of enzyme structure and activity by protein engineering. *Angew. Chem. (Int. Ed.)*, **23**, 467–73 (1984).
16. *Fersht A. R., Wilkinson A. J., Carter P. J., Winter G.* Fine structure-activity analysis of mutations at position 51 of tyrosyl-tRNA synthetase. *Biochemistry (USA)*, **24**, 5858–61 (1985).

17. *Fersht A.R., Shi J.P., Knill-Jones J., Lowe D.M., Wilkinson A.J., Blow D.M., Brick P., Carter P., Waye M.M.Y., Winter G.* Hydrogen bonding and biological specificity analyzed by protein engineering. *Nature*, **314**, 235-8 (1985).
18. *Fried H.E., Kaiser E.T.* Oxidation of dithiols by flavopapain. *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 182-4 (1981).
19. *Gardell S.J., Craik C.S., Hilvert D., Urdea M.S., Rutter W.J.* Site-directed mutagenesis shows that tyrosine 248 of carboxypeptidase A does not play a crucial role in catalysis. *Nature*, **317**, 551-5 (1985).
20. *Gillam S., Smith M.* Site-specific mutagenesis using synthetic oligodeoxyribonucleotide primers: I. Optimum conditions and minimum oligodeoxyribonucleotide length. *Gene*, **8**, 81-97 (1979).
21. *Hutchinson C.A., Phillips S., Edgell M.H., Gillam S., Jahnke P., Smith M.* Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. I. *Biol. Chem.*, **253**, 6551-60 (1978).
22. *Jones H.D., McMillan A.J., Fersht A.R., Winter G.* Reversible dissociation of dimeric tyrosyl-tRNA synthetase by mutagenesis at the subunit interface. *Biochemistry (USA)*, **24**, 5852-7 (1985).
23. *Kaiser E.T., Levine H.L., Otsuki T., Fried H.E.* Studies on the mechanism of action and stereochemical behaviour of semisynthetic model enzymes. *Adv. Chem. Ser.*, **191**, 35-48 (1980).
24. *Kaiser E.T., Lawrence D.S., Rokita S.E.* The chemical modification of enzymatic specificity. *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 565-95 (1985).
25. *Kaminski Z.W., Jezewska M.M.* Intermediate dehydrogenase-oxidase form of xanthine oxidoreductase in rat liver. *Biochem. J.*, **181**, 177-82 (1979).
26. *Levine H.L., Nakagawa Y., Kaiser E.T.* Flavopapain: Synthesis and properties of semisynthetic enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 64-70 (1977).
27. *Levine H.L., Kaiser E.T.* Oxidation of Dihyronicotinamides by Flavopapain. *J. Amer. Chem. Soc.*, **100**, 7670-7 (1978).
28. *Levine H.L.* Stereospecificity in the oxidation of NADH by flavopapain. *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 343-5 (1980).
29. *Lowe D.M., Fersht A.R., Wilkinson A.J., Carter P., Winter G.* Probing histidine-substrate interactions in tyrosyl-tRNA synthetase using asparagine and glutamine replacements. *Biochemistry (USA)*, **24**, 5106-9 (1985).
30. *Mansson M.-O., Larrsson P.-O., Mosbach K.* Covalent binding of an NAD analogue to liver alcohol dehydrogenase resulting in an enzyme-coenzyme complex not requiring exogenous coenzyme for activity. *Eur. J. Biochem.*, **86**, 455-63 (1978).
31. *Mansson M.-O.* Recycling by a second enzyme of NAD covalently bound to alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.*, **98**, 309-13 (1979).
32. *Margalit R., Pecht I., Gray H.B.* Oxidation-reduction catalytic activity of a pentaammineruthenium(III) derivative of sperm whale myoglobin. *J. Amer. Chem. Soc.*, **105**, 301-2 (1983).
33. *Messing J.* New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.*, **101**, 20-78 (1983).
34. *Mosbach K.* Immobilised enzymes. *Meth. Enzymol.*, XLIV (1976).
35. *Offord R.E.* Semisynthetic proteins. John Wiley, Chichester, 1979.
36. *Perry L.J., Wetzel R.* Disulfide bond engineered into T4 lysozyme: Stabilization of the protein towards thermal inactivation. *Science*, **226**, 555-7 (1984).
37. *Plapp B.V.* Enhancement of the activity of horse liver alcohol dehydrogenase by modification of amino groups at the active sites. *J. Biol. Chem.*, **245**, 1727-35 (1970).
38. *Razin A., Hirose T., Itakawa K., Riggs A.D.* Efficient correction of a mutation by use of chemically synthesised DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **75**, 4268-75 (1978).
39. *Rosemeyer H., Kornig E., Seela F.* Adenosine deaminase covalently linked to soluble dextran. The effect of immobilisation on thermodynamic and kinetic parameters. *Eur. J. Biochem.*, **122**, 375-80 (1982).
40. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.* DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **74**, 5463-7 (1977).
41. *Schaffner M.A., Wilson G.S.* Spectral and electron transfer properties of sepharose 6MB-immobilized cytochrome c. *J. Biol. Chem.*, **258**, 12835-41 (1983).
42. *Shimizu T.* Enhancement of 14S and 30S dynein adenosine triphosphatase activities by modification of amino groups with trinitrobenzenesulfonate. A comparison with modification of SH groups. *J. Biochem. (Tokyo)*, **85**, 1412 (1979).
43. *Shortle D., Nathans D.* Local mutagenesis: a method for generating viral mutants with base substitutions in preselected regions of the viral genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **75**, 2170-4 (1978).
44. *Shortle D., Grisafi P., Benkovic S.J., Botstein D.* Gap misrepair mutagenesis: efficient site directed induction of transition, transversion and frameshift mutations *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **79**, 1588-92 (1982).
45. *Sigal I.S., Harwood B.G., Arentzen R.* Thiol- β -lactamase: Replacement of the active site serine of RTEM β -lactamase by a cysteine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, **79**, 7157-60 (1982).
46. *Sigal I.S., DeGrado W.F., Thomas B.J., Petteway S.R.* Purification and properties of thiol β -lactamase. *J. Biol. Chem.*, **259**, 5327-32 (1984).

47. *Slama J. T., Orugati S. R., Kaiser E. T.* Semisynthetic enzymes. Synthesis of a new flavopapain with high catalytic efficiency. *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 6211-3 (1981).
48. *Spomer W. E., Wotton J. F.* The hydrolysis of α -N-benzoyl-L-argininamide catalysed by trypsin and acetyltrypsin. Dependence on pH. *Biochim. Biophys. Acta*, **235**, 164-71 (1971).
49. *Sproat B. S., Gait M. J.* Solid-phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the phosphotriester method. In *Oligonucleotide synthesis - a practical approach* (ed. M. J. Gait), pp. 83-115. IRL Press, Oxford, 1984.
50. *Thomas P. G., Russell A. J., Fersht A. R.* Tailoring the pH dependence of enzyme catalysis using protein engineering. *Nature*, **318**, 375-6 (1985).
51. *Urabe I., Yamamoto M., Yamada Y., Okada H.* Effect of hydrophobicity of acyl groups on the activity and stability of acylated termolysin. *Biochim. Biophys. Acta*, **524**, 435-41 (1978).
52. *Valenzuela P., Bender M. L.* Kinetic properties of succinylated and ethylenediamine-amidated δ -chymotrypsins. *Biochim. Biophys. Acta*, **250**, 538-48 (1971).
53. *Villafranca J. E., Howell E. E., Voet D. H., Strobel M. S., Ogden R. C., Abelson J. N., Kraut J.* Directed mutagenesis of dihydrofolate reductase. *Science*, **222**, 782-8 (1983).
54. *Wallace R. B., Schold M., Johnson M. J., Dembek P., Itakura K.* Oligonucleotide directed mutagenesis of the human α -globin gene: a general method for producing point mutations in cloned DNA. *Nucleic Acid Res.*, **9**, 3647-56 (1981).
55. *Wells T. N. C., Fersht A. R.* Hydrogen bonding in enzymatic catalysis analyzed by protein engineering. *Nature*, **316**, 656-7 (1985).
56. *Wilkinson A. J., Fersht A. R., Blow D. M., Winter G.* Site-directed mutagenesis as a probe of enzyme structure and catalysis: tyrosyl-tRNA synthetase cysteine 35 to glycine 35 mutation. *Biochemistry (USA)*, **22**, 3581-6 (1983).
57. *Wilkinson A. J., Carter P., Winter G.* A large increase in enzyme-substrate affinity by protein engineering. *Nature*, **307**, 187-8 (1984).
58. *Winter G., Fersht A. R., Wilkinson A. J., Zoller M., Smith M.* Redesigning enzyme structure by site-directed mutagenesis: Tyrosyl tRNA synthetase and ATP binding. *Nature*, **299**, 756-8 (1982).
59. *Zahorsky O. R.* Immobilised enzymes. CRC Press, Ohio, 1973.
60. *Zoller M. J., Smith M.* Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Meth. Enzymol.*, **100**, 468-500 (1983).

БИОЭЛЕКТРОХИМИЯ

А. Потенциометрические сенсоры

Глава 9

Ионоселективные электроды и биосенсоры на их основе

С. С. Куан, Дж. Дж. Гилболт

9.1. Введение

Измерение рН – одна из наиболее часто встречающихся процедур в химической лаборатории. Стекланный электрод, чувствительный к ионам водорода, и электрод сравнения в комбинации с высокоомным вольтметром образуют исключительно полезный аналитический прибор – рН-метр. Достоинствами этой системы являются быстрота, чувствительность, низкая стоимость, воспроизводимость, а также то, что в процессе измерения проба не расходуется и может использоваться вновь. Это относится и к другим ИСЭ, которые появились в последние годы. В настоящее время можно приобрести или разработать за умеренную стоимость ИСЭ, чувствительные к определенным катионам или анионам. Рабочий диапазон этих сенсоров обычно охватывает концентрации от 10^{-1} до 10^{-5} М, хотя многие сенсоры можно использовать и при более низких концентрациях. Поскольку отклик ИСЭ является логарифмическим, воспроизводимость измерений остается постоянной во всем их динамическом диапазоне.

ИСЭ широко применяют в биологических исследованиях, особенно в клинической химии, где из-за большого числа образцов и необходимости быстрого анализа многие более медленные и сложные методы непригодны.

Ферментные электроды относятся к самым последним достижениям аналитической химии. Эти устройства сочетают в себе селективность и чувствительность ферментативных методов анализа со скоростью и простотой измерений с помощью ИСЭ. В результате появилось устройство, позволяющее быстро измерять концентрацию определенного соединения в растворе, и метод, требующий минимальной пробоподготовки. Разработаны ферментные электроды для определения глюкозы, мочевины, L-аминокислот, пенициллина и других веществ, важных в клинической практике.

9.2. Ионоселективные электроды

Открытие наиболее известного из ИСЭ – чувствительного к ионам водорода, или рН-электрода, – относится к началу века, когда Кремер [7] и Хабер и Клеменсиевич [29] обнаружили, что некоторые стекла чувствительны к активности ионов водорода. Отклик стеклянного электрода на изменение рН считали результатом миграции ионов водорода через тонкую стеклянную мембрану. Исследования Каремана и Эйзенмана [32], а также работа Стефановой и др. [45] обеспечили теоретический фундамент, необходимый для разработки новых ИСЭ. В настоящее время известны ИСЭ, чувствительные к ионам Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , NH_4^+ , S^- , I^- , Br^- , CN^- , SCN^- , F^- , NO_3^- , ClO_4^- , Vg^- и, конечно, H^+ . Электроды выпускаются многими фирмами, причем в результате разработки новых методов их изготовления появились комплекты для сборки различных электродов в общем корпусе или оболочке.

ИСЭ можно определить как устройство, выходной электрический потенциал которого пропорционален логарифму активности какого-либо иона в растворе. Иногда для характеристики электрода используют термин «специфичный», имея в виду, что он реагирует только на один определенный ион. Поскольку ни один электрод не является в действительности специфичным, термин «ионоселективный» авторы считают более подходящим.

Вид функции ИСЭ к иону i с активностью a и зарядом z описывается уравнением Никольского:

$$E = \frac{2,303RT}{zF} \lg [a_i + k_{ij}(a_j)^{(z/y)}] + \text{const}, \quad (9.1)$$

где E — измеряемый потенциал; R — газовая постоянная, равная $8,314 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \text{ К}^{-1}$; T — абсолютная температура, К; F — число Фарадея, равное $96487 \text{ Кл} \cdot \text{моль}^{-1}$; k_{ij} — коэффициент селективности; y и a_j — соответственно заряд и активность мешающего иона j . Первый член правой части уравнения (9.1) положителен для катионов и отрицателен для анионов.

Коэффициент селективности количественно характеризует чувствительность ИСЭ к основному иону i в присутствии мешающего иона j . Чем меньше значение k_{ij} для данного электрода, тем выше допустимая концентрация j , не приводящая к значительной погрешности измерения. Значение k_{ij} можно рассчитать по уравнению

$$\pm \frac{E_2 - E_1}{2,303 RT/zF} = \lg k_{ij} + \left(\frac{z}{y} - 1 \right) \lg a_i, \quad (9.2)$$

где E_1 и E_2 — потенциалы электрода, измеренные в чистых растворах, содержащих соответственно основной и мешающий ион с одной и той же активностью. На практике k_{ij} можно определить, измеряя потенциал ИСЭ в растворах с постоянной активностью мешающего иона a_j и изменяющейся активностью основного иона a_i . Тогда k_{ij} можно рассчитать по уравнению

$$a_i = k_{ij}(a_j)^{z/y}, \quad (9.3)$$

где a_i — значение активности иона i в точке, в которой наблюдается заметное отклонение от нернстовской функции.

В настоящее время ИСЭ можно разделить на несколько видов, в зависимости от состава их чувствительных мембран.

1. Стекланные электроды. Чувствительным элементом в них является очень тонкая стеклянная мембрана, обычно в виде пузырька. Селективность мембраны определяется составом стекла. Известны стекланные электроды, чувствительные к ионам H^+ (рН-электрод) и другим катионам. В диапазоне концентраций от 10^{-1} до 10^{-5} М чувствительность электрода к определенному иону уменьшается в ряду $\text{Ag}^+ > \text{H}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+, \text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$.

2. Твердотельные электроды. К ним относятся ИСЭ, в которых чувствительным элементом служит тонкий моно- или поликристалл либо осадок с ионной проводимостью. Эти электроды делят на два класса: гомогенные и гетерогенные. У первых мембрана выполнена в виде таблетки, получаемой из осадка, смеси осадков или монокристалла. У вторых осадок или смесь осадков диспергированы в инертном носителе, например силиконовой резине или поливинилхлориде (ПВХ).

3. Жидкостные ионообменные электроды. Их готовят растворением органического ионита в подходящем растворителе. Раствор удерживается инертным носителем. Для приготовления ИСЭ используют такие иониты, как комплексы (например, переходных металлов с производными 1, 10-фенантролина), четвертичные аммониевые соли, ортофосфатные комплексы или антибиотики. В некоторых

случаях ионит и растворитель вводят в инертный полимерный носитель, например ПВХ или полиметилметакрилат, и наносят на платиновую проволоку или графитовый стержень.

4. Существует особый тип электродов, представляющий собой ИСЭ, поверхность мембраны которых расположена специальная оболочка. Оболочкой может служить газопроницаемая мембрана, в результате чего электрод становится чувствительным, например, к CO_2 или NH_3 . Газ диффундирует через мембрану и изменяет рН внутреннего раствора в электроде. Изменение рН, измеряемое стеклянным электродом, пропорционально концентрации газа, проходящего через мембрану. Успешно используют также покрытия, содержащие фермент, который превращает субстрат в ион, детектируемый ИСЭ.

Все эти электроды подробно обсуждаются во второй части настоящей главы.

При использовании ИСЭ для потенциометрического измерения активности данного иона в растворе важно помнить, что потенциал электрода определяется именно активностью иона. Следовательно, вещества, которые могут связывать определяемый ион и понижать его активность, необходимо либо удалять, либо маскировать. Нередко требуется использовать буферный раствор, чтобы контролировать ионную силу и рН, а также предотвратить изменение активности иона вследствие окисления, восстановления или комплексообразования.

В литературе имеется много сообщений о применении, разработке и производстве ИСЭ. Важным достижением было использование ПВХ для изготовления ИСЭ. По сравнению с электродами старой конструкции электроды с мембраной из ПВХ при тех же характеристиках намного дешевле и обычно служат дольше. Муди и др. [37] разработали кальцийселективный электрод на основе жидкого ионита, введенного в мембрану из ПВХ, а Гриффитс и др. [15] подобрали для него оптимальную концентрацию кальциевого ионита. Изготовленный таким способом электрод имеет почти нернстовскую зависимость потенциала от концентрации ионов кальция (30 мВ/рСа) в $2,6 \cdot 10^{-2} - 6,0 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ растворах CaCl_2 . Дэвис и др. [8] изготовили нитратселективные электроды, вводя в ПВХ соответствующие жидкие иониты, выпускаемые промышленностью. В этих электродах практически решена проблема утечки, с которой приходится иметь дело в других конструкциях электродов на основе жидкого ионита.

Валиномицин в разнообразных нейтральных носителях использовали для изготовления калийселективного электрода [41]. Время отклика электрода этого типа обычно меньше 3 с, а рабочий диапазон концентраций — от 10^{-1} до 10^{-5} М . Электрод, изготовленный из таких материалов, является исключительным в том смысле, что в течение трех дней его потенциал меняется очень мало или вообще не меняется. По мере улучшения рабочих характеристик существующих и создания новых электродов устройства этого типа, очевидно, будут находить все более широкое применение.

Активно разрабатываются ИСЭ для определения кальция в биологических материалах, поскольку ион кальция играет большую роль в физиологии человека [38]. Чаще всего используют электрод на основе жидкого ионита — раствора дидецилфосфата кальция в дидецилфенилфосфонате. Рабочий диапазон концентраций такого электрода — от 10^0 до 10^{-5} М кальция. Электрод чувствителен к ионам кальция; если требуется определить общее содержание кальция в пробе, перед измерениями необходимо разрушить комплексные соединения кальция.

Нормальное содержание кальция в сыворотке крови меняется от 8,5 до 10,5 мг/100 мл для взрослых и от 9,0 до 11,0 мг/100 мл для детей [47]. Из этого количества 30–55% кальция присутствует в виде соединений с белками, 5–10% — в виде различных комплексов и оставшаяся часть — в ионизированной форме [38]. Содержание ионов кальция в сыворотке крови определяли авторы [30, 34]. Стандартные растворы для таких анализов должны содержать 150 мМ натрия, что примерно соответствует

концентрации последнего в сыворотке. Амманн и др. [2] разработали новый кальцийселективный электрод с нейтральным носителем. Чувствительность этого электрода к кальцию намного выше, чем к натрию и магнию.

Хорошо изучено семейство электродов на основе чистого сульфида серебра или его смесей с галогенидами серебра [43, 44]. Осадки этих солей либо спрессовывают в таблетку, либо смешивают с инертным носителем, например силиконовой резиной. Электрод на основе чистого сульфида серебра чувствителен к ионам S^{2-} и Ag^+ в диапазоне их концентраций $10^0 - 10^{-7}$ М. При помощи этого электрода определяют сульфид-ионы в природных водах и серебро в низких концентрациях.

Мембрана электрода, сформированная из смеси галогенида и сульфида серебра, ведет себя так, как если бы она состояла из чистого галогенида серебра. Так готовят электроды на иодид-, бромид- и хлорид-ионы. Иодидный электрод чувствителен также к цианид-ионам. Смешивая в мембране роданид серебра с серебром, можно получить электрод, чувствительный к роданид-ионам. Коэффициенты селективности галогенидных и псевдогалогенидных электродов можно оценить по уравнению

$$k_{ij} = \frac{\text{Произведение растворимости } Ag_i}{\text{Произведение растворимости } Ag_j}, \quad (9.4)$$

где Ag_i и Ag_j — соли серебра с анионом i и j соответственно.

Жидкостные ионообменные электроды, чувствительные к нитрат-, перхлорат-, фтороборат- и хлорид-ионам, обычно работают в диапазоне от 10^{-1} до 10^{-5} М. Хлоридселективный электрод этого типа не столь чувствителен к сульфид- и галогенид-ионам, как твердотельный электрод. Поэтому его можно использовать в тех случаях, когда нельзя исключить присутствие сульфидов или галогенидов. Перхлоратные и фтороборатные электроды имеют ограниченное применение в анализе. Однако нитратный электрод широко используют для прямого определения нитратов.

Стекланные электроды для определения одно- и двухзарядных катионов применяют в множестве клинических и экологических исследований. Калий/натриевый стеклянный электрод использовали для определения этих катионов в морской воде [14]. Возможно определение натрия в воде при содержаниях порядка 10^{-9} % [5]. При помощи натриевого ИСЭ определяли натрий в моче [4]. Известно и много других примеров использования стекланных электродов в экологической и клинической химии. Тем, кто интересуется этими проблемами, рекомендуем книгу [9] под редакцией Эйзенмана, сборник Национального бюро стандартов [33], а также гл. 20 настоящей книги.

Для изготовления катионселективных электродов успешно используют антибиотики и подобные им соединения. Мы уже упоминали разработанный Амманном и др. [2] кальцийселективный электрод. Пиода и др. [42] исследовали свойства антибиотика нонактина как активного компонента мембраны. Электрод на основе нонактина с инертным носителем чувствителен к NH_4^+ , причем в диапазоне концентраций $10^{-1} - 10^{-4}$ М его функция является почти нернстовской и характеризуется величиной 51 мВ/р NH_4^+ . Этот электрод слабо реагирует на изменение активности иона Li^+ , а его избирательность к NH_4^+ в присутствии K^+ и Na^+ оказалась существенно выше, чем у стеклнного электрода. Нонактиновый электрод используют в одной из ферментных систем, которая будет рассмотрена ниже. Изучен также калийселективный электрод на основе валиномицина [11]. Валиномицин может быть в виде раствора в подходящем органическом растворителе либо в инертном носителе [41]. Изготовленные таким способом электроды использовали для определения калия в сыворотке крови [12]. Для электрода на основе антибиотика допустимы более высокие концентрации натрия, чем в случае калиевого стеклнного электрода. Более подробно ИСЭ с нейтральными переносчиками рассмотрены в написанной Эйзенманом главе для сборника Национального бюро стандартов [9].

Наконец, следует упомянуть о газочувствительных электродах с газопроницаемой мембраной, отделяющей от внешней среды внутренний раствор и рН-электрод. Существуют электроды этого типа, чувствительные к аммиаку, диоксиду углерода и сероводороду. Наиболее широкое применение нашли CO_2 -электроды, используемые для определения p_{CO_2} в крови [28, 52]. Аммиачные электроды используют для прямого определения аммиака в природных водах и твердых телах; при помощи этих электродов можно определять концентрации аммиака или ионов аммония в самых разнообразных пробах, поскольку работе прибора мешают только газы, диффундирующие через мембрану.

9.3. Ферментные электроды

Классический потенциометрический ферментный электрод представляет собой комбинацию ИСЭ с иммобилизованным (нерастворимым) ферментом, который обеспечивает высокую селективность и чувствительность определения конкретного субстрата. В табл. 9.1 перечислены некоторые ИСЭ, пригодные для конструирования ферментных

Таблица 9.1. Ионоселективные электроды, используемые в ферментных электродах

Потенциометрический датчик	Субстрат/фермент
NH_3	Мочевина, аминокислоты, глутамин, глутаминовая кислота, нитраты, нитриты, креатинин/лиазы и деаминазы
CO_2	Мочевина, аминокислоты/декарбоксилазы
рН	Пенициллин, РНК, ДНК, глюкоза/ферменты, катализирующие реакции с изменением рН
I^-	Глюкоза, аминокислоты, холестерин, спирты
CN^-	Амигдалин

электродов. Достоинствами таких потенциометрических сенсоров являются простота оборудования (требуется только рН-метр, тогда как для амперометрических сенсоров необходима полярографическая установка), низкая стоимость, доступность большого числа хороших и надежных базовых ИСЭ.

Концентрация «растворимого» ферментного электрода (гл. 1) впервые была выдвинута Кларком и Лайонсом [6] в 1962 г. Однако лишь в 1971 г. была создан [50] первый работающий ферментный электрод на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной в геле на поверхности полярографического кислородного электрода, который позволяет определять глюкозу в биологических жидкостях и тканях. Ферментные электроды могут работать и как вольтамперометрические, и как амперометрические датчики, то есть измеряется ток при приложенном постоянном напряжении. В 1969 г. Гилболт и Монгалвб [19] предложили первый потенциометрический (измеряется потенциал системы без наложения внешнего напряжения) ферментный электрод для определения мочевины. С тех пор в литературе описано более ста различных электродов; данные о них суммированы в недавно вышедшей книге Гилболта [16].

В ферментных электродах ферменты обычно иммобилизуют, что позволяет уменьшить расход материалов для проведения рутинных анализов и исключить частую проверку ферментного препарата для получения воспроизводимых результатов. Кроме того, устойчивость фермента часто увеличивается при введении его в подходящий гелевый носитель. Например, электрод для определения мочевины с химически связанной уреазой на поверхности аммонийного ИСЭ может работать более 300 дней [16].

Для иммобилизации фермента используют два метода: химическую модификацию фермента введением групп, снижающих его растворимость, и физический захват фермента инертным носителем, например крахмалом или полиакриламидом (гл. 6). Для изготовления электродных датчиков более всего подходит химическая иммобилизация.

Функционирование ферментного электрода можно рассматривать как пятистадийный процесс, включающий: 1) подвод субстрата к поверхности электрода; 2) диффузию субстрата через мембрану к активному центру; 3) реакцию в активном центре; 4) перенос продукта ферментативной реакции через мембрану к поверхности электрода; 5) определение продукта вблизи поверхности электрода. Первая стадия – подвод субстрата – сильно зависит от скорости перемешивания раствора. Интенсивное перемешивание обеспечивает быстрый перенос субстрата к поверхности электрода. Если сделать мембрану очень тонкой и использовать высокоактивный фермент, то 2-я и 4-я стадии исключаются или оказывают минимальное влияние. Стадия 3 также является очень быстрой, поэтому время отклика ферментного электрода теоретически должно быть близким к времени отклика базового электрода. Многие исследователи приводят экспериментальные данные, показывающие, что это достижимо при использовании тонкой мембраны и быстром перемешивании.

9.4. Методика изготовления типичного электрода

Берут базовый электрод (выбранный из табл. 9.1) и переворачивают его рабочим концом вверх (рис. 9.1, б). Покрывают мембраной из кусочка стенки кишки поросенка (фирма Universal Sensors, Нью-Орлеан, США). Мембрану смачивают 30 мкл 25%-ного раствора альбумина, затем добавляют фермент (в количестве, соответствующем 10 ед. активности), растворив его в растворе альбумина. Добавляют 5 мкл 25%-ного раствора глутарового альдегида для завершения иммобилизации и дают мембране высохнуть. Далее закрывают сенсор диализной мембраной (целлофан толщиной 20–25 мкм фирм Will Scientific, Arthur Thomas, Sigma и др.), размером примерно вдвое больше диаметра электрода. Надевают на целлофановую мембрану резиновое кольцо с диаметром, точно соответствующим размеру электрода, и осторожно надвигают его на корпус электрода, так чтобы фермент лежал тонким однородным слоем на рабочей поверхности электрода. Электрод помещают на ночь в буферный раствор, с тем чтобы раствор проник к ферменту и вытеснил захваченный воздух. Хранить электрод необходимо в буферном растворе (оптимальном для данной ферментной системы) на холоду.

9.4.1. Аппаратура

Готовый ферментный электрод используют подобно любому ионоселективному электроду. Потенциометрические датчики, например на мочевины, аминокислоты, пенициллин, соединяют непосредственно с цифровым милливольтметром (Orion, Corning, Sargent, Amel и др.) Показания милливольтметра для каждой пробы представляют в виде зависимости от логарифма концентрации.

Вместе с ферментным электродом используют электрод сравнения, обычно каломельный. Электрод сравнения может быть конструктивно объединен с ферментным электродом, как, например, в случае NH_3^- , CO_2^- и O_2^- электродов, используемых в качестве базовых в сенсорах мочевины, аминокислот, глюкозы или спирта.

Наконец, электрод должен быть помещен в раствор, перемешиваемый с постоянной скоростью, поскольку ее изменение может вызвать изменение измеряемого электродного потенциала.

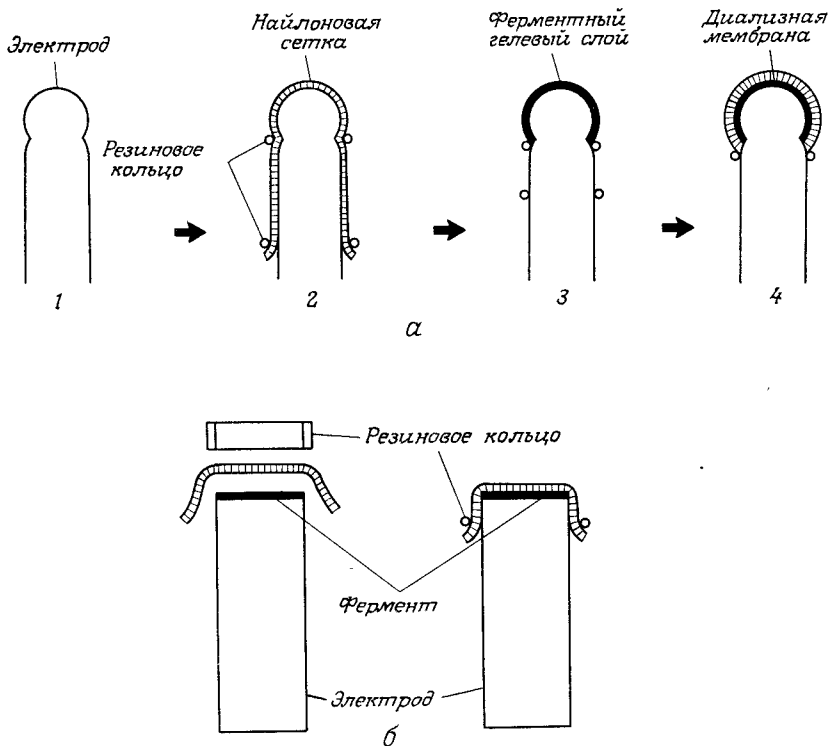
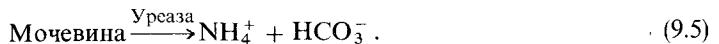


Рис. 9.1. Изготовление ферментных электродных датчиков: а – физическое удерживание; б – химически связанные ферменты.

9.5. Рабочие характеристики электродов

В табл. 9.2 перечислены некоторые ферментные электроды, предназначенные для анализа обычных субстратов, и приведены их основные характеристики. Полный перечень существующих электродов можно найти в книге Гилболта [16].

В некоторых случаях можно использовать разные базовые электроды. Например, для мочевинового датчика можно использовать катионоселективный электрод и определять концентрацию ионов NH_4^+ , образующихся при гидролизе мочевины в присутствии уреазы:



В другом варианте используют электроды для определения NH_3 (который образуется при подщелачивании раствора по реакции $\text{OH}^- + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O}$) или CO_2 (образуется при подкислении раствора: $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$). Лучшим сенсором является NH_3 -электрод, характеризующийся высокой специфичностью и низким пределом обнаружения (10^{-6} М, а в случае CO_2 -электрода – $5 \cdot 10^{-5}$ М). Недостатком этого электрода являются большие времена отклика (2–4 мин) и возвращения к нулевой линии (5–10 мин). Так, показано [18], что при химическом связывании уреазы с полипропиленовой мембраной, являющейся составной частью газопроницаемой мембраны NH_3 -электрода, при помощи одного электрода можно выполнить 200–1000

Таблица 9.2. Типичные ферментные электроды и их характеристики

Определяемое вещество	Фермент	Специфичность сенсора	Способ иммобилизации ^а	Стабилен в течение	Время отклика, мин	Количество фермента, U	Диапазон определяемых концентраций ^б , M
1. Мочевина	Уреаза (ЕС 3.5.1.5)	Катион -»- -»- H ⁺ Газ (NH ₃) Газ (NH ₃) Газ (CO ₂)	Физическая	3 нед.	0,5-1	25	10 ⁻² -5·10 ⁻⁵
			-»-	2 нед.	1-2	75	10 ⁻² -10 ⁻⁴
			Химическая	>4 мес.	1-2	10	10 ⁻² -10 ⁻⁴
			Физическая	3 нед.	5-10	100	5·10 ⁻³ -5·10 ⁻⁵
			Химическая	4 мес.	2-4	10	5·10 ⁻² -5·10 ⁻⁵
			-»-	20 дней	1-4	0,5	10 ⁻² -10 ⁻⁴
			Физическая	3 нед.	1-2	25	10 ⁻² -10 ⁻⁴
2. Глюкоза	Глюкозооксидаза	H ⁺	Растворенный фермент	1 нед.	5-10	100	10 ⁻¹ -10 ⁻³
			Химическая	>1 мес.	2-8	10	10 ⁻³ -10 ⁻⁴
3. L-Аминокислоты (сумма) ^а	L-Аминокислотная оксидаза (ЕС 1.4.3.2)	Катион NH ₄ ⁺ I ⁻	Физическая	2 нед.	1-2	10	10 ⁻² -10 ⁻⁴
			Химическая	>1 мес.	1-3	10	10 ⁻² -10 ⁻⁴
			-»-	>1 мес.	1-3	10	10 ⁻³ -10 ⁻⁴
L-Тирозин	L-Тирозиндекарбоксилаза (ЕС 1.1.25)	Газ (CO ₂)	Физическая	3 нед.	1-2	25	10 ⁻¹ -10 ⁻⁴
L-Глутамин	Глутаминаза (ЕС 3.5.1.2)	Катион	Растворенный фермент	2 дней ^г	1	50	10 ⁻¹ -10 ⁻⁴
			То же	2 дней ^г	1	50	10 ⁻¹ -10 ⁻⁴
L-Глутаминовая кислота	Глутамалдегидрогеназа (ЕС 1.4.1.3)	-»-	То же	2 дней ^г	1	50	10 ⁻¹ -10 ⁻⁴
L-Аспарагин	Аспарагиназа (ЕС 3.5.1.1)	-»-	Физическая	1 мес.	1	50	10 ⁻² -5·10 ⁻⁵
4. D-Аминокислоты (сумма) ^а	D-Аминокислотная оксидаза (ЕС 1.4.3.3)	-»-	-»-	1 мес.	1	50	10 ⁻² -5·10 ⁻⁵
			-»-	1 мес.	1	50	10 ⁻² -5·10 ⁻⁵

Определяемое вещество	Фермент	Специфичность сенсора	Способ иммобилизации ^а	Стабилен в течение	Время отклика, мин	Количество фермента, U	Диапазон определяемых концентраций ^б , M
5. Пенициллин	Пенициллиназа (ЕС 3.5.2.6)	H ⁺	—»— Растворенный фермент	1–2 нед. 3 нед.	0,5–2 2	400 1000	10 ⁻² –10 ⁻⁴ 10 ⁻² –10 ⁻⁴
6. Амигалин	β-Глюкозидаза (ЕС 3.2.1.21)	CN ⁻	Физическая	3 дней ^с	10–20	100	10 ⁻² –10 ⁻⁵
7. Нитрат	Нитратредуктаза/ нитритредуктаза (ЕС 1.9.6.1/1.6.6.4)	NH ₄ ⁺	Растворенный фермент	1 дня	2–3	10	10 ⁻² –10 ⁻⁴
8. Нитрит	Нитритредуктаза (ЕС 1.6.6.4)	Газ (NH ₃)	Химическая	3–4 мес.	2–3	10	5·10 ⁻² –10 ⁻⁴

^а «Физическая иммобилизация» означает удерживание в полиакриламидном геле; «химическая иммобилизация» — химическое связывание фермента глутаровым альдегидом с альбумином, полиакриловой кислотой или акриламидом после его физического захвата.

^б Соответствует области линейной функции ферментного электрода либо, если наблюдается отклонение от линейности, значительно измененно потенциала.

^в Электрод чувствителен к L-цистеину, L-лейцину, L-тирозину, L-триптофану, L-фенилаланину и L-метионину.

^д Электрод чувствителен к D-фенилаланину, D-валину, D-метионину, D-лейцину, D-норлейцину и D-изолейцину.

^е Время, необходимое для возвращения сигнала к базовой линии перед повторным использованием.

анализов с погрешностью 2,5% в диапазоне концентраций от $5 \cdot 10^{-5}$ до 10^{-2} М. За один час можно выполнить как минимум 20 анализов, результаты которых отлично коррелируют с данными, полученными спектрофотометрическим методом с диацетиллом.

Для большинства ферментных электродов электродная функция выполняется в интервале концентраций от 10^{-2} до 10^{-4} М. Этот интервал может быть расширен в сторону увеличения до 10^{-1} М (в зависимости от растворимости субстрата в воде) и в сторону меньших концентраций – до 10^{-5} М или ниже (в зависимости от чувствительности базового электрода).

Об износе ферментного электрода можно судить по следующим изменениям его характеристик: 1) со временем верхняя граница рабочего диапазона уменьшается приблизительно от 10^{-1} до 10^{-2} М; 2) наклон градуировочного графика зависимости потенциала от логарифма концентрации (С), исходно составляющий 60 мВ/рС (Нернстовская зависимость), уменьшается до 50, 40, возможно, 30 мВ/рС или даже ниже; 3) по мере старения фермента увеличивается время отклика электрода, исходно составляющее от 30 с до 4 мин (что приблизительно соответствует времени отклика базового электрода).

При изготовлении ферментного электрода важна высокая степень очистки фермента (удельная активность не ниже 10 ед. активности/мг), что позволяет уменьшить его количество. В этом случае время отклика биосенсора минимально и приближается к времени отклика базового электрода. Как видно из табл. 9.1, обычно используют не менее 10 И (1 мг) фермента.

Стабильность электрода зависит от способа иммобилизации фермента. Электроды с химически связанным ферментом более стабильны (один электрод можно использовать для 500–1000 анализов), а время их хранения составляет 6–14 месяцев.

9.6. Примеры ферментных сенсоров на основе ионоселективных электродов

9.6.1. Некоторые наиболее распространенные приложения ферментных электродов

9.6.1.1. Определение мочевины (диагностический показатель функции печени). В первом электроде для определения мочевины, разработанном Гилболтом и Монгалво [19], уреазу иммобилизовали в полиакриламидном носителе на сетках из нейлона или дакрона, помещаемых на чувствительный к ионам аммония катионселективный электрод фирмы Векман. Позже те же авторы [20] описали усовершенствованный электрод, покрытый целлофановой мембраной, который можно использовать в течение 21 дня без потери активности.

Для улучшения избирательности определения мочевины в качестве базового использовали аммонийселективный электрод на основе нонактина с мембраной из силиконовой резины, а уреазу иммобилизовали в полиакриловом геле [22]. Гилболт и др. [27] использовали трехэлектродную систему, что позволило проводить измерения в разбавленных растворах при постоянном уровне помех. Такой ферментный электрод стабильно работал четыре месяца.

Авторы [3] полимеризовали уреазу непосредственно на поверхности мембраны газоаммиачного электрода (фирмы Orion) с помощью глутарового альдегида. При этом в реакционном ферментном слое генерируется достаточно много аммиака даже при рН 7–8, что позволяет определять мочевины в присутствии больших количеств Na^+ и K^+ . Время отклика такого электрода 2–4 мин.

Описан [40] сенсор мочевины с физически удерживаемой уреазой и регистрацией

изменения рН с помощью стеклянного электрода. Время отклика сенсора составляло 7–10 мин, его функция была линейной в диапазоне $5 \cdot 10^{-5} - 10^{-2}$ М с наклоном 0,8 ед. рН/рС.

В качестве мочевинового сенсора можно использовать также покрытый уреазой CO_2 -электрод, чувствительный к другому продукту каталитического гидролиза мочевины, HCO_3^- . По данным Гилболта [25] на работу этого электрода не влияют Na^+ и K^+ , а его функция линейна в диапазоне $10^{-4} - 10^{-2}$ М.

Александр и Джозеф [1] описали электрод на мочевины, представляющий собой чувствительную к изменениям рН проволоку из металлической сурьмы, покрытую слоем уреазы. Время отклика этого электрода 1–2 мин, его функция линейна в диапазоне концентраций $5 \cdot 10^{-4} - 10^{-2}$ моль/л мочевины при наклоне 44 мВ/рС. Позже Джозеф [31] описал мочевиновый сенсор, состоящий из газовой мембраны и аммоний-селективного электрода на основе металлической сурьмы. Этот микросенсор реагирует на изменение концентрации мочевины в диапазоне $10^{-4} - 10^{-2}$ моль/л в течение 30–45 с. Он значительно быстрее возвращается к нулевой линии, чем коммерческие газомембранные электроды, что является значительным преимуществом.

Гилболт и Масцини [18] создали обеспечивающий высокую избирательность и воспроизводимость результатов ферментный сенсор мочевины, используя уреазу, химически связанную и закрепленную на усовершенствованной тефлоновой мембране газоаммиачного мембранного электрода. Один такой электрод позволяет проводить от 200 до 1000 измерений с коэффициентом вариации 2,5% в диапазоне концентраций $5 \cdot 10^{-5} - 10^{-2}$ моль/л; за один час можно выполнить не менее 20 анализов.

Описаны [48] ферментные сенсоры мочевины, в которых уреазы с помощью глутарового альдегида фиксируется либо на газовом CO_2 -, либо на катионоселективном стеклянном электроде. При использовании в качестве базового аммонийного стеклянного электрода диапазон определяемых концентраций составляет $10^{-5} - 10^{-1}$ моль/л.

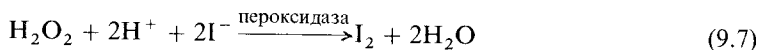
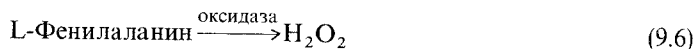
9.6.1.2. Определение креатинина (диагностический показатель функции печени). Для создания первого креатининового электрода [46] использовали неочищенную креатининазу с аммонийным датчиком. Работая с аналогичной системой, Гилболт и др. [26] иммобилизовали очищенную уреазу на шариках из алкиламинного стекла, закрепленных на мешалке, а в качестве чувствительного элемента применили аммиачный электрод. Остаточное содержание аммиака в сыворотке крови понижали, используя различные способы удаления.

Гилболт и Коле [21] разработали усовершенствованный электрод для прямого избирательного определения креатинина, используя высокоспецифичную креатининазу (фирмы Carlo Erba). Функция этого электрода линейна в области 1–100 мг%. В системе для определения креатинина, предложенной в работе [49], используется три фермента: креатининамидогидролаза (СА), креатинамидогидролаза (СІ) и саркозиноксидаза (SO), соиммобилизованные на пористой поверхности ацетилцеллюлозной мембраны. На основе электрода, чувствительного к пероксиду водорода, разработано два мультиферментных электрода – один для определения суммы креатинина и креатина с СА/СІ/SO-мембраной и один для определения креатина с СІ/SO-мембраной. В скоростном режиме время отклика электродов составляет 20 с с пределом обнаружения 1 мг/л. С одним электродом можно выполнять более 500 анализов, причем при хранении его в течение девяти месяцев при 4 °С не наблюдается потери активности.

Масцини и др. [35] предложили ферментную реакционную систему, включающую растворимый NADPH, α -кетоглутарат и глутаматдегидрогеназу, иммобилизованную на нейлоновых трубках, которая позволяет удалять 98% аммиака из человеческой крови и мочи за 50 с. Такое снижение содержания аммиака позволяет использовать датчик на аммиак вместе с иммобилизованной креатининазой (фирмы Carlo Erba,

Clinibond) для определения малых концентраций креатинина в крови и моче. Для анализа требуется всего 200 мкл пробы, причем весь процесс проводится в потоке.

9.6.1.3. Определение аминокислот. Ферментные электроды широко применяют в клинических анализах, поскольку некоторые аминокислоты (тирозин, фенилаланин, триптофан, метионин) являются важными диагностическими индикаторами. Первые такие электроды [17] представляли собой катионоселективный электрод, чувствительный к образующимся при ферментативном окислении аминокислот ионам аммония, на котором был иммобилизован слой L-аминокислотной оксидазы из змеиного яда. Гилболт и Надь [23] разработали два различных типа сенсоров для определения L-фенилаланина в крови. В сенсоре одного типа полиакриламидный слой, содержащий смесь L-аминокислотной оксидазы с пероксидазой, наносили на иодидселективный электрод. Этот датчик регистрирует уменьшение активности иодид-ионов на поверхности электрода в результате следующих реакций:



В сенсоре второго типа использовали аммонийселективный электрод на основе нонактина с мембраной из силиконовой резины, покрытой L-аминооксидазой в полиакриламидном геле. Этот сенсор имеет более широкий диапазон линейности электродной функции и более избирателен, чем сенсор первого типа.

Для определения L-тирозина в биологических жидкостях опробован [25] сенсор на основе CO_2 -электрода, покрытого тирозиндекарбоксилазой. Электродная функция этого сенсора линейна в диапазоне концентраций $2,5 \cdot 10^{-4} - 10^{-2}$ М, а его время отклика несколько меньше, чем у аналогичного мочевинового электрода.

Гилболт и Шу [24] описали ферментный электрод для определения глутамина на основе глутаминазы, удерживаемой нейлоновой сеткой между слоем целлофана и катионоселективным электродом. Электродная функция этого сенсора к глутамину выполняется в диапазоне концентраций $0,1 - 10^{-4}$ моль/л при времени отклика всего 1–2 мин.

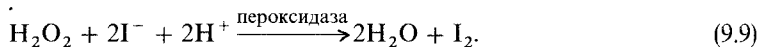
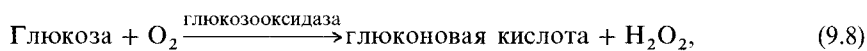
Уайт и Гилболт [51] разработали полностью специфичный ферментный электрод для определения L-лизина. Этот электрод не чувствителен к любым D- или L-аминокислотам, за исключением L-лизина. Электрод можно использовать для определения L-лизина в образцах сложного состава, при этом не требуется проводить разделение или применять специальное оборудование (например, анализатор аминокислот). Такие электроды вполне стабильны, а их функция линейна в диапазоне концентраций L-лизина от $5 \cdot 10^{-5}$ до 0,1 моль/л. Единственное ограничение — довольно большое время отклика, составляющее 5–10 мин.

Фунг и др. [13] предложили специфичный электрод для определения L-метионина, изготовленный иммобилизацией L-метионин- γ -лиазы (ЕС 4.4.1.11) на селективном к NH_3 электроде. α , γ -Расщепление L-метионина приводит к образованию α -кетобутирата, метантиола и аммиака. С очищенным ферментом реагирует только метионин; диапазон линейности сенсора $10^{-5} - 10^{-2}$ моль/л.

Хавас и Гилболт разработали еще один потенциометрический электрод для прямого определения L-тирозина в биологических жидкостях. Чувствительным элементом датчика является мембранный CO_2 -электрод, покрытый слоем иммобилизованной апо- L-тирозиндекарбоксилазы. Функция ферментного электрода линейна в диапазоне $4 \cdot 10^{-5} - 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л, причем другие L-аминокислоты или D-тирозин не оказывают мешающего влияния.

9.6.1.4. Определение глюкозы и сахара. Как уже отмечалось, определение глюкозы исключительно важно, так как используется для диагностики диабета.

Надь и др. [39] описали полуэлектрод для определения глюкозы с мембраной на основе иодида:



Высокочувствительный иодидный датчик регистрирует уменьшение активности иодид-иона на его поверхности. Определение глюкозы можно проводить как в потоке, так и в стационарных условиях. Из крови необходимо предварительно удалять восстановители, такие, как аскорбиновая кислота, тирозин и мочевая кислота.

Для изготовления ферментных рН-электродов Нильсон и др. [40] использовали обычные стеклянные рН-электроды, на которые наносили либо фермент, удерживаемый в полиакриламидном геле, либо слой жидкости, удерживаемый внутри целлофановой мембраны. При определении глюкозы по концентрации глюконовой кислоты, образующейся в реакции (9.8), рН-функция сенсора почти линейна в интервале от 10^{-4} до 10^{-3} моль/л, причем при десятикратном изменении концентрации глюкозы рН меняется на 0,85. Разработаны также электроды этого типа для определения мочевины и пенициллина. Для контроля ионной силы и рН используют разбавленный (1 мМ) фосфатный буферный раствор с рН 6,9 и 0,1 М раствор сульфата натрия.

9.6.1.5. Определение пенициллина. Еще один очень важный электрод – пенициллиновый, широко используемый для контроля содержания пенициллина в бродильных средах. Он представляет собой рН-электрод, покрытый иммобилизованной пенициллиназой, которая катализирует реакцию



Электрод характеризуется очень небольшим временем отклика (< 30 с); наклон градуировочного графика составляет 52 мВ/рС в диапазоне концентраций $5 \cdot 10^{-2}$ – 10^{-4} М [40].

9.7. Производство ферментных датчиков

Иммобилизованные ферменты в сочетании с ИСЭ используют в нескольких выпускаемых промышленностью приборах. Фирма Owens–Illinois разработала сенсор для определения мочевины, используя иммобилизованную уреазу и чувствительный к аммиаку электрод. Патентные права на эту систему приобретены фирмой Technicon, которая распространяет ее в Европе.

Полуэлектроды на основе ИСЭ производит только фирма Universal Sensors (P. O. Box 736, New Orleans, La. 70148, USA), которая предлагает датчики для определения мочевины, аминокислот и других веществ с иммобилизацией фермента при помощи глутарового альдегида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alexander P. W., Joseph J. P. Anal. Chim. Acta, **131**, 103 (1981).
2. Ammann D., Pretsch E., Simon W. Calcium ion-selective electrode based on a neutral carrier. Anal. Lett., **5**, 843–50 (1972).

3. *Anfalt T., Granelli A., Jagner D.* Urea electrode based on the ammonia probe. *Anal. Lett.*, **6**, 969–75 (1973).
4. *Annino J.S.* Determination of sodium in urine by specific ion electrode. *Clin. Chem.*, **13**, 227–32 (1967).
5. *Budd A.L., Jones R.H.* *The Analyzer*, **4**, 5 (1963).
6. *Clark L., Lyons C.* Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **102**, 29–45 (1962).
7. *Cremer M. Z. Biol.*, **47**, 562 (1906).
8. *Davies J.E.W., Moody G.J., Thomas J.D.R.* Nitrate ion selective electrodes based on polyvinyl chloride matrix membranes. *Analyst (London)*, **97**, 87–94 (1972).
9. *Glass electrodes for hydrogen and other cations.* Eisenman G. (ed.). Marcel Dekker, New York, 1967.
10. *Eisenman G.* In *Ion-selective electrodes*, Special Publication 314 (ed. R. A. Durst). National Bureau of Standards, Washington D. C., 1969.
11. *Eyal E., Rechnitz G.A.* Mechanistic studies on the valinomycin-based potassium electrode. *Anal. Chem.*, **43**, 1090–3 (1971).
12. *Frant M.S., Ross J.W.* Potassium ion specific electrode with high selectivity for potassium over sodium. *Science*, **167**, 987–8 (1970).
13. *Fung K.W., Kuan S.S., Sung H.Y., Guilbault G.* Methionine selective enzyme electrode. *Anal. Chem.*, **51**, 2319–24 (1979).
14. *Garrels R.M.* Ion sensitive electrodes and individual ion activity coefficients. In *Glass electrodes for hydrogen and other cations* (ed. G. Eisenman). Marcel Dekker, New York, 1967, pp. 344–61.
15. *Griffiths G.H., Moody G.J., Thomas J.D.R.* Optimum composition of polyvinyl chloride matrix membranes used for selective calcium-sensitive electrodes. *Analyst (London)*, **97**, 420–7 (1972).
16. *Guilbault G.* *Handbook of immobilized enzymes.* Marcel Dekker, New York, 1984.
17. *Guilbault G., Hrabankova E.* L-amino acid electrode. *Anal. Letters*, **3**, 53–7 (1970).
18. *Guilbault G., Mascini M.* Urease coupled ammonia electrode for urea determination in blood serum. *Anal. Chem.*, **49**, 795–8 (1977).
19. *Guilbault G., Montalvo J.* *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 2164 (1969).
20. *Guilbault G.* *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 2533 (1970).
21. *Guilbault G., Coulet P.R.* Creatinine-selective enzyme electrodes. *Anal. Chim. Acta*, **152**, 223–8 (1983).
22. *Guilbault G., Nagy G.* Improved urea electrode. *Anal. Chem.*, **45**, 417–19 (1973).
23. *Guilbault G., Nagy G.* Enzyme electrodes for the determination of L-phenylalanine. *Anal. Lett.*, **6**, 301–12 (1973).
24. *Guilbault G., Shu F.* Electrode for the determination of glutamine. *Anal. Chim. Acta*, **56**, 333–40 (1971).
25. *Guilbault G.* Enzyme electrodes based on the use of a carbon dioxide sensor. *Anal. Chem.*, **44**, 2161–6 (1972).
26. *Guilbault G., Chen S., Kuan S.* A creatinine specific enzyme electrode. *Anal. Letters*, **13**, 1607–24 (1980).
27. *Guilbault G., Kuan S., Nagy G.* Improved electrode for the assay of urea in blood. *Anal. Chim. Acta*, **67**, 195–201 (1973).
28. *Haake.* Brinkman Instruments, Cantiague Rd., Westbury, New York, U.S.A., 1975.
29. *Haber F., Klemensiewicz Z.* *Z. Phys. Chem.*, **67**, 385 (1909).
30. *Hatner R.S., Johnson J.W., Bernstein D.S., Wachman A., Brackman J.* *Clin. Chim. Acta*, **28**, 67 (1970).
31. *Joseph J.P.* An enzyme microsensor for urea based on an ammonia gas electrode. *Anal. Chim. Acta*, **169**, 249–56 (1985).
32. *Karrenman G., Eisenman G.* *Bull. Math. Biophys.*, **24**, 413 (1962).
33. *Khuri R.N.* In *Ion-selective electrodes*, Special Publication 314 (ed. R. A. Durst). National Bureau of Standards, Washington D. C., 1969, p. 287.
34. *Li T.K., Piechoki J.T.* *Clin. Chem.*, **17**, 411 (1971).
35. *Mascini M., Fortunati S., Moscova D., Palleschi G.* Ammonia abatement in an enzymic flow system for the determination of creatinine in blood sera and urine. *Anal. Chim. Acta*, **171**, 175–84 (1985).
36. *Moody G.J., Thomas J.D.R.* Development and publication of work with ion-sensitive electrodes. *Talanta*, **19**, 623–39 (1972).
37. *Moody G.J., Oke R.B., Thomas J.D.R.* Calcium-sensitive electrode based on a liquid ion exchange in a polyvinyl chloride matrix. *Analyst (London)*, **95**, 910–18 (1970).
38. *Moore E.W.* In *Ion-selective electrodes*, Special Publication 314 (ed. R. A. Durst). National Bureau of Standards, Washington D. C., 1969, p. 215.
39. *Nagy G., von Storp H., Guilbault G.* Enzyme electrode for glucose based on an iodide membrane sensor. *Anal. Chim. Acta*, **66**, 443–55 (1973).
40. *Nilsson H., Akerlund A., Mosbach K.* Determination of glucose, urea and penicillin using enzyme pH electrodes. *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 529–34 (1973).

41. *Pick J., Toth K., Pungor E., Vasak M., Simon W.* Potassium-selective silicone rubber membrane electrode based on a neutral carrier. *Anal. Chim. Acta*, **64**, 447–80 (1973).
42. *Pioda L., Wachter M., Dohner R., Simon W.* *Helv. Chim. Acta*, **50**, 1373 (1967).
43. *Pungor E.* Theory and application of anion selective electrodes. *Anal. Chem.*, **39** (13), 28A (1967).
44. *Rechnitz G. A.* Ion selective electrodes: a review. *Chem. Eng. News June*, **12**, 146 (1967).
45. *Стефанова О. К., Шульц М. М., Матерова Е. А., Никольский Б. П.* Вестник ЛГУ. 1963. Т. 4. С. 93.
46. *Thompson H., Rechnitz G.* Ion electrode based enzymic analysis of creatinine. *Anal. Chem.*, **46**, 246–9 (1974).
47. *Tietz N. W.* Fundamentals of clinical chemistry. Saunders, Philadelphia, 1970, p. 637.
48. *Tran-Minh C., Brown G.* Construction and study of electrodes using cross-linked enzymes. *Anal. Chem.*, **47**, 1359 (1975).
49. *Tsuchida T., Yoda K.* Multi-enzyme membrane electrodes for determination of creatinine and creatine in serum. *Clin. Chem.*, **29**, 51–5 (1983).
50. *Updike S. J., Hicks G. P.* The enzyme electrode. *Nature*, **214**, 986–8 (1971).
51. *White C., Guilbault G.* Lysine specific enzyme electrode for determination of lysine in grains and food. *Anal. Chem.*, **50**, 1481–5 (1978).
52. *Winters I.* Acid base physiology in medicine. The London Co., Cleveland, Ohio, USA, 1981.

Глава 10

Потенциометрические биосенсоры на основе редокс-электродов

Лемюэль Б. Уингард-младший, Джеймс Кастнер

10.1. Введение

Развитие потенциометрических биосенсоров часто связывают с продолжением исследований в области ИСЭ. Такое представление обусловлено двумя причинами. Во-первых, большинство высокоимпедансных электрохимических биосенсоров, описанных в литературе, включают ИСЭ; во-вторых, многие признают, что причиной разработки этих модифицированных электродов было просто желание расширить аналитические возможности базового датчика.

Теория, типы и рабочие характеристики биосенсоров на основе ИСЭ рассмотрены в предыдущей главе. Здесь мы обсудим еще один тип таких устройств, а именно биосенсоры на основе редокс-электродов. Они менее избирательны и, следовательно, могут иметь более разнообразные применения. Чтобы понять принципиальные различия между двумя типами потенциометрических биосенсоров, сравним эти системы.

Биосенсоры на основе ИСЭ и редокс-электродов имеют следующие общие черты:

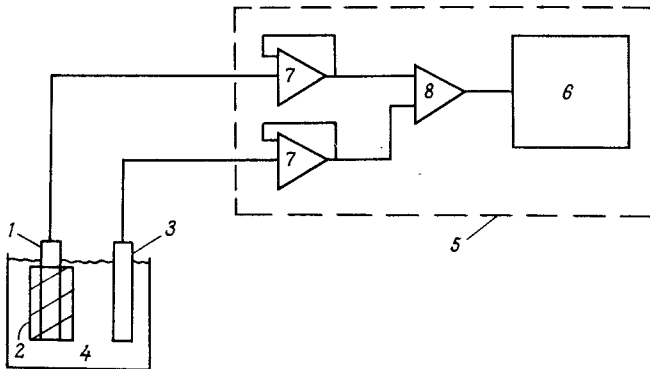
1) Их селективность определяется биологической активностью материала, непосредственно связанного с рабочим электродом.

2) Аналитический сигнал, в данном случае э.д.с., измеряется в условиях нулевого тока, что обуславливает необходимость использования высокоимпедансной измерительной аппаратуры.

3) Потенциал индикаторного электрода измеряется относительно стабильного электрода сравнения, как схематически показано на рис. 10.1.

Потенциометрические биосенсоры с ИСЭ и редокс-электродами различаются по электрохимическим реакциям, протекающим на соответствующих электродах. В ИСЭ чувствительным элементом является мембрана с избирательной проницаемостью, и это позволяет следить за событиями, связанными с ионным обменом на границе раздела мембрана/раствор (рис. 10.2) [7]. Классическими примерами селективно

Рис. 10.1. Общая электрическая схема для измерения потенциала биосенсора при индикаторном электроде, отличном от ИСЭ. 1—индикаторный электрод; 2—биологический материал на индикаторном электроде; 3—электрод сравнения; 4—электролит, содержащий определяемое вещество; 5—высокоимпедансный потенциометр; 6—дисплей; 7—операционный усилитель токового повторителя; 8—компаратор.



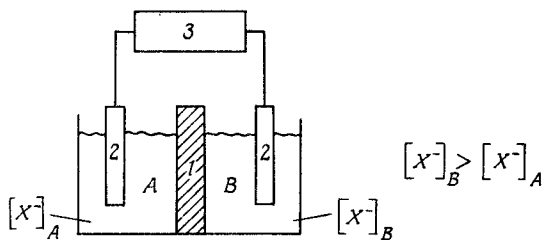
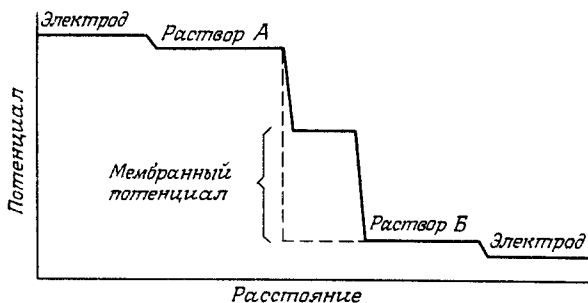


Рис. 10.2. Распределение потенциала в системе с ионоселективным электродом. Межфазные потенциалы показаны как разности потенциалов электродов и прилегающих растворов. 1—ионообменная мембрана с фиксированными отрицательными зарядами; 2—платиновые электроды; 3—потенциометр.

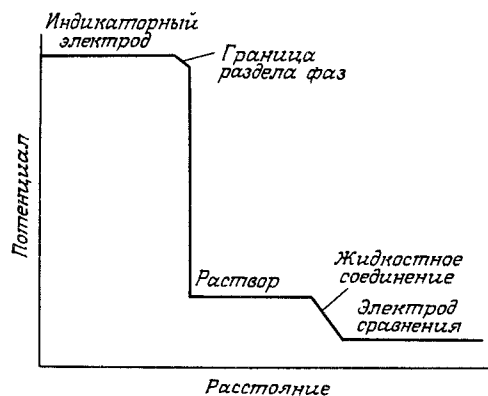
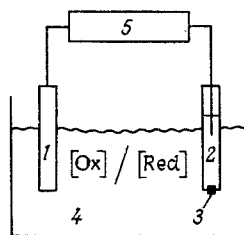


проницаемых мембран являются рН-стекло, кристаллы фторида лантана, легированные ионофорами пленки из ПВХ. Редокс-электроды изготавливают, как правило (хотя и не обязательно), из благородных металлов, и они проявляют нернстовскую зависимость потенциала от отношения концентраций окисленных и восстановленных частиц в исследуемом растворе. Выбор Pt, Au и Ag в качестве электродных материалов обусловлен тем, что эти металлы хорошо проводят ток и в то же время химически инертны. Из сказанного выше непосредственно следует, что для любой редокс-пары измеряемые потенциалы не должны зависеть от материала электрода. На практике это, однако, не всегда соблюдается, о чем свидетельствует предостережение Адамса [1] относительно использования электродов из благородных металлов: «Один из бесспорных выводов из методологии использования платиновых электродов (большая часть сказанного далее относится и к электродам из золота и вообще благородных металлов) заключается в том, что почти всегда для получения воспроизводимых результатов предварительную обработку электрода следует проводить дважды».

При публикации результатов электрохимических измерений с помощью редокс-электродов принято сообщать методическую информацию о состоянии индикаторного электрода. Она включает в себя сведения о методике очистки поверхности электрода, чистоте раствора и молекулярном строении поверхности (т. е. является ли материал поли- или монокристаллическим). Ниже приведен пример, показывающий влияние способа обработки поверхности платины на потенциометрический сигнал ряда редокс-электродов на основе глюкозооксидазы. Влияние предварительной обработки может быть обусловлено тем, что на поверхности благородного металла или другого электродного материала (например, стеклоуглерода) имеются электрохимически активные функциональные группы. Присутствие этих частиц может сказываться на правильности и воспроизводимости результатов соответствующих редокс-измерений.

Аналитическая применимость редокс-электродов зависит также от выбора электрода сравнения. Это, однако, относится не только к редокс-датчикам, но и к датчикам на основе ИСЭ. Глубокая проработка этого вопроса выходит за рамки данного раздела.

Рис. 10.3. Распределение потенциала в редокс-электродной системе. 1—индикаторный электрод; 2—электрод сравнения с внутренним раствором электролита; 3—пористая пробка (жидкостное соединение); 4—редокс-пара в растворе (отношение концентраций окисленной и восстановленной форм определяет потенциал); 5—потенциометр.



Роль электрода сравнения схематически показана на рис. 10.3. Как видно, исследуемый раствор отделен от внутреннего электролита электрода сравнения жидкостным мостиком. В этом мостике, включающем обычно пробку из пористого стекла, может возникнуть градиент концентрации ионов и, соответственно, разность потенциалов. Величина этого потенциала определяется процессом диффузии заряженных частиц и со временем меняется. В эксперименте диффузионные потенциалы, возникающие в жидкостном мостике, можно контролировать двумя способами. Во-первых, можно подобрать такие ионы по обе стороны жидкостного соединения, чтобы отношение заряд/подвижность для всех из них было одним и тем же. Второй способ — градуировка электрода сравнения в стандартном растворе. Теория электродных жидкостных соединений детально рассмотрена в работах [2, 9] и имеющихся в них ссылках. Таким образом, биосенсоры на основе редокс-электродов имеют те же ограничения, что и системы с ИСЭ. Однако в случае редокс-систем имеется дополнительное ограничение, связанное с недостаточностью сведений о взаимосвязи химии поверхности электрода и наблюдаемых потенциалов. С другой стороны, редокс-электроды могут иметь меньшее время отклика, поскольку отсутствует массоперенос через границу раздела. Кроме того, обычно редокс-электрод имеет более низкое электрическое сопротивление, чем типичный ИСЭ, поэтому для него требуется недорогое измерительное оборудование, т. е. приборы с низким входным импедансом. Редокс-системы менее селективны и, следовательно, имеют более широкий диапазон приложений.

10.2. Примеры биосенсоров на основе редокс-электродов

В принципе существуют два подхода к созданию потенциометрических биосенсоров на основе редокс-электродов: можно конструировать либо биокаталитическую поверхность, либо блокированную границу раздела. В качестве примеров биокатализа на

поверхностях редокс-электродов можно привести работы с глюкозооксидазой [3, 11], глицериндегидрогеназой [4] и уреазой [8]. В системе с блокированной границей раздела можно использовать комплекс антителио – антиген, который служит промежуточным звеном для передачи потенциометрического сигнала, обуславливаемого изменениями концентрации определяемого компонента. Упомянутые системы изучены экспериментально, однако ни одна из них еще не нашла практического применения.

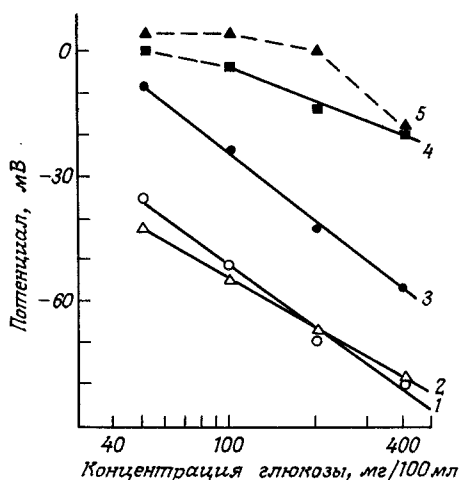
Из приведенных выше примеров наиболее хорошо изучена, по-видимому, глюкозооксидазная редокс-электродная система [3, 10–12]. Глюкозооксидаза катализирует реакцию между β -D-глюкозой и O_2 с образованием глюконолактона и пероксида водорода. Как отмечено во введении, в биокаталитических ферментных редокс-электродных системах оксидоредуктазный фермент иммобилизован на поверхности электрода, а определяемое вещество находится в растворе. Другие редокс-системы могут включать: 1) иммобилизацию кофактора фермента, например порфирина или флавина, на поверхности электрода в расчете на то, что содержащиеся в пробе апоферменты смогут катализировать окисление или восстановление иммобилизованных редокс-центров; 2) иммобилизацию фермента и медиатора на поверхности электрода. Работая с глюкозооксидазой, мы иммобилизовали фермент на электроде из благородного металла или углерода. Предполагается, что потенциал этих электродов зависит от концентрации глюкозы, кислорода и пероксида водорода в растворе, а также наличия функциональных групп на поверхности платины или углерода. Ниже приведена методика и результаты работы с глюкозооксидазным редокс-электродом.

Глюкозооксидазу (в чистом виде или в смеси с каталазой) иммобилизуют на платине, пористом графите или золоте. Такая система дает непосредственный потенциометрический сигнал в растворах глюкозы при pH 7,4. Методика приготовления может быть, например, следующей. В буферном растворе фосфата натрия (pH 7,4) смешивают каталазу, лиофилизованную глюкозооксидазу из *A. niger*, бычий сывроточный альбумин и глутаровый альдегид. Смесь выливают в формочку, в которой находится диск из платиновой фольги толщиной 0,05 мм. Толщину поперечно-сшитой фермент-альбуминовой матрицы можно менять с помощью прокладок на дне формы, например от 0,05 до 0,32 см. При комнатной температуре сшивка белков глутаровым альдегидом длится 2 ч. Перед проверкой ферментативной активности или потенциометрическими измерениями сшитый глутаровым альдегидом слой отмывают буферным раствором в течение 1–2 дней, чтобы удалить слабосвязанный фермент [11].

Сшитый фермент-альбуминовый слой толщиной 0,32 см содержит около 8 мкг глюкозооксидазы (приблизительно 0,8 ед. активности). Как обычно, кажущуюся активность иммобилизованного фермента можно определить фотометрически с *o*-дiazинидином и пероксидазой, используя глюкозу и кислород в качестве субстратов. В данном случае она составляет всего 0,0044 ед., или менее 1% ожидаемой для 8 мкг глюкозооксидазы активности. Такое низкое значение объясняется диффузионными ограничениями, налагаемыми сшитым носителем. Следовательно, можно ожидать, что активность глюкозооксидазы будет обратно пропорциональна толщине сшитого фермент-альбуминового слоя.

При прямых потенциометрических измерениях глюкозооксидазный электрод и Ag/AgCl электрод сравнения погружают в насыщенный кислородом раствор глюкозы, pH которого поддерживают в пределах от $6,0 \pm 0,1$ до $7,5 \pm 0,1$ с помощью 0,1 M буферного раствора фосфата натрия. Потенциалы можно измерять любым подходящим потенциометром, например Keithley 610C. На рис. 10.4 приведены типичные результаты для ферментного слоя различной толщины, нанесенного на одну сторону платинового диска. При удалении покрытого ферментом платинового диска из формочки ферментный слой получается очень тонким ($\sim 0,02$ см). Если же диск находится в формочке, толщина ферментного слоя составляет 0,05–0,24 см. Как видно

Рис. 10.4. Потенциометрический отклик глюкозо-оксидазного платинового электрода в насыщенном кислородом растворе глюкозы при pH 7,4 (0,1 М буферный раствор фосфата натрия). Потенциалы рассчитывали как разность измеренных и фоновых значений (без глюкозы). Электрод сравнения — Ag/AgCl (в 1 М KCl). Кривые проведены с помощью метода наименьших квадратов. 1, 2 — покрытый ферментным слоем платиновый диск, извлеченный из ванночки; 3–5 — платиновый диск с толщиной ферментного слоя 0,05 (3), 0,16 (4) и 0,24 см (5) (измерения проводили, не извлекая диск из ванны).



из рис. 10.4, зависимость является нернстовской при концентрациях глюкозы 50–400 мг/100 мл. Это представляет интерес для клинического определения глюкозы, поскольку нормальный уровень содержания глюкозы в крови находится в интервале 90–120 мг/100 мл.

Аналогичные линейные зависимости наблюдаются и при нанесении глюкозооксидазного слоя на пористый графит вместо платины (рис. 10.5). Однако при этом график зависимости потенциала от логарифма концентрации глюкозы имеет положительный, а не отрицательный наклон, как в случае платинового электрода [12]. Рассмотрим возможные механизмы возникновения потенциометрического сигнала для этих двух случаев (детально они обсуждаются в работах [3, 12]).

Источником потенциометрического сигнала, по-видимому, является окисление или восстановление функциональных групп на поверхности электрода пероксидом водорода, образующимся в катализируемом глюкозооксидазой процессе окисления глюкозы. Следовательно, редокс-пара, сигнал которой измеряется, присоединена к поверхности электрода, а не находится в свободном виде в растворе, как показано на рис. 10.3. В случае платины с увеличением концентрации глюкозы потенциал становится более отрицательным (рис. 10.4). Это означает, что на поверхности платины имеет место восстановление. Наклон кривых на рис. 10.4 составляет около -40 мВ/рС глюкозы и,

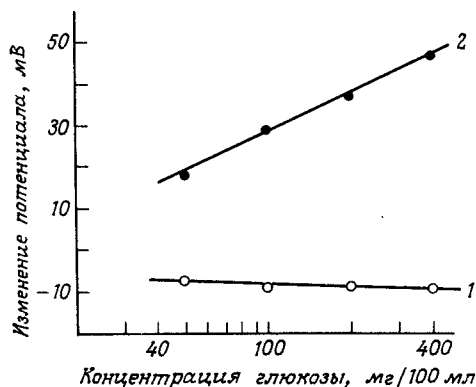
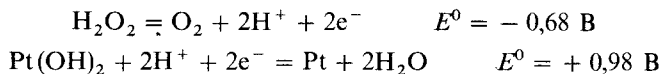


Рис. 10.5. Потенциометрический отклик покрытого глюкозооксидазой электрода из пористого графита в насыщенном кислородом растворе глюкозы при pH 7,4 (0,1 М буферный раствор фосфата натрия). 1 — графитовый электрод; 2 — такой же электрод, покрытый слоем глюкозооксидазы на носителе.

как отмечалось выше, не зависит от способа предварительной обработки поверхности платины [3]. Такое значение наклона заставляет предположить, что в электрохимическом переносе заряда участвует больше одного, но меньше двух электронов. Вероятно, это результат наложения нескольких реакций, протекающих параллельно или последовательно. Могут иметь место, в частности, следующие реакции с положительным суммарным потенциалом E^0 (хотя очень вероятны и другие, одноэлектронные процессы):



Считают, что в водном растворе образование оксида платины начинается с обратимого присоединения ОН-групп к поверхностному слою атомов платины. При примерно монослойном покрытии внешние слои платины подвергаются необратимой перестройке, в результате чего ОН-группы входят в кристаллическую решетку платины [6]. Точно не известно, какой именно одноэлектронный процесс имеет место при окислении платины. Таким процессом может быть восстановление части платины через промежуточное состояние окисления +1. Влияние рН на измеряемые потенциалы непосредственно не изучалось, поскольку изменение рН раствора очень сильно влияет на активность ферментов. Однако варьирование рН между 5,4 и 8,4 не оказывает заметного влияния на потенциал «голового» (в отсутствие фермента) платинового электрода. Очевидно, чтобы объяснить, как возникает потенциометрический сигнал на платине, необходимо лучше понять химические процессы в системе платина–кислород–вода–пероксид водорода.

В случае углеродного электрода (рис. 10.5) наклон зависимости потенциала от логарифма концентрации глюкозы положителен и составляет около 30 мВ/рС. Это говорит о том, что на поверхности электрода имеет место двухэлектронная реакция окисления. Пористые графитовые электроды содержат как альдегидные, так и гидрохинонные функциональные группы [5], которые могут подвергаться двухэлектронному окислению с образованием соответственно карбоновых кислот и хинонных групп. Однако необходимы дополнительные эксперименты, чтобы более детально выяснить, что является источником потенциометрического сигнала.

Величина потенциометрического сигнала существенно зависит от способа предварительной обработки поверхности платинового электрода. Об этом свидетельствуют результаты, полученные при обработке платиновых электродов следующими способами: нагреванием в газовом пламени; электрохимическим окислением; электрохимическим восстановлением; электрохимической нейтрализацией и электрохимическим осаждением тетрахлорида платины. В случае нейтрализации, окислительной и пламенной обработки обнаруживаются существенные различия в наклонах зависимости потенциометрического сигнала от концентрации глюкозы для обычного и покрытого ферментным слоем платиновых электродов [3]. Позже обычные платиновые электроды, подвергнутые пламенной и электрохимической обработке, изучали методом электронной спектроскопии (ЭСХА) [10]. Термически обработанная платина содержит меньше углеродистых примесей на поверхности, чем электрохимически обработанная; с другой стороны, при электрохимической обработке поверхность платины окисляется в большей степени, чем в пламени. В последнем случае поверхность платины загрязняется кремнием, диффундирующим из ее объема.

Основным недостатком глюкозооксидазных платиновых электродов является плохая воспроизводимость поверхностных потенциалов. Каждый такой электрод характеризуется линейной зависимостью потенциала от логарифма концентрации глюкозы. Однако при повторном использовании, если концентрация глюкозы изменяется в обратном направлении, может наблюдаться явление гистерезиса. Впрочем, потенциал

«голового» платинового электрода также трудно поддерживать на постоянном уровне при повторных измерениях. Очевидно, необходимы дополнительные исследования для выработки подхода, позволяющего более полно описать редокс-процессы на поверхности платины или найти простой способ переградуировки электродов при дрейфе их потенциала. Альтернативой может быть присоединение к поверхности потенциометрически инертного электрода известной редокс-пары.

Вероятно, потребуются значительные усилия, прежде чем потенциометрический редокс-электрод можно будет внедрить в имплантируемый сенсор для регулировки системы подачи инсулина *in vivo*. Конструктивно потенциометрический редокс-электрод и его компоненты весьма просты. Поэтому такие системы весьма заманчиво использовать для контроля сточных систем и контроля и регулирования некоторых ферментеров. Однако в системах, в которых в реакцию вступает большое количество субстрата (например, глюкозы), могут возникать проблемы, связанные с низкой скоростью подачи второго субстрата (например, кислорода) или отсутствием механизма регенерации окисленного кофактора.

Благодарность

Настоящая работа выполнена по гранту National Institutes of Health.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Adams R. N.* Electrochemistry at solid electrodes, pp. 206–8. Marcel Dekker, New York, 1969.
2. *Bard A. J., Faulkner L. R.* Electrochemical Methods, pp. 62–72. Wiley, New York, 1980.
3. *Castner J. F., Wingard L. B., Jr.* Alterations in potentiometric response of glucose oxidase platinum electrodes resulting from electrochemical or thermal pretreatments of a metal surface. *Anal. Chem.*, **56**, 2891–6 (1984).
4. *Chen A. K., Starzmann J. A., Liu C. C.* Potentiometric quantitation of glycerol using immobilized glycerol dehydrogenase. *Biotechnol. Bioeng.* **24**, 971–5 (1982).
5. *Evans J. F., Kuwana T.* Introduction of functional groups onto carbon electrodes via treatment with radio-frequency plasmas. *Anal. Chem.*, **51**, 358–65 (1979).
6. *Hoare J. P.* In *Encyclopedia of electrochemistry of the elements* (ed. A. J. Bard), pp. 210–38. Marcel Dekker, New York, 1974.
7. *Irving H. M. N. H.* Recommendations for nomenclature of ion-selective electrodes. *Pure Appl. Chem.*, **48**, 127–32 (1976).
8. *Joseph J. P.* A miniature enzyme electrode sensitive to urea. *Mikrochim. Acta*, **2**, 473–79.
9. *Plambeck J. A.* *Electroanalytical chemistry: basic principles and applications*, pp. 168–77. Wiley, New York, 1982.
10. *Proctor A., Castner J. F., Wingard L. B., Jr., Hercules D. M.* Electron spectroscopic (ESCA) studies of platinum surfaces used for enzyme electrodes. *Anal. Chem.*, **57**, 1644–9 (1985).
11. *Wingard L. B., Jr., Cantin L. A., Castner J. F.* Effect of enzyme-matrix composition on potentiometric response to glucose using glucose oxidase immobilized on platinum. *Biochim. Biophys. Acta*, **748**, 21–7 (1983).
12. *Wingard L. B., Jr., Castner J. F., Yao S. J., Wolfson S. K., Jr., Drash A. L., Liu C. C.* Immobilized glucose oxidase in the potentiometric detection of glucose. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **9**, 95–104 (1984).

Б. Амперометрические сенсоры

Глава 11

Принципы работы амперометрических сенсоров

Джордж С. Уилсон

11.1. Введение

Амперометрическое детектирование находит широкое применение при анализе биологических сред. В оптимальных условиях метод позволяет определять концентрации до 10^{-8} – 10^{-9} М, при этом величина сигнала варьируется в пределах трех–четырёх порядков. В связи с биосенсорами имеет смысл рассмотреть основные особенности амперометрии и их влияние на сигнал детектора.

Наложение разности потенциалов между электродом сравнения и индикаторным электродом приводит к росту тока, который в свою очередь зависит от концентрации анализируемых электроактивных частиц в растворе. Измеряемый ток может быть непосредственно связан со скоростью электрохимической реакции, протекающей на индикаторном электроде. Важно, однако, найти и научиться контролировать условия, от которых зависит, какая стадия лимитирует скорость всего электрохимического процесса. Скорость гетерогенного переноса электрона (i_{ct}), протекающего непосредственно на электроде, можно контролировать, изменяя приложенный потенциал в соответствии с уравнением Бутлера–Фольмера [10]. Таким образом, во многих системах можно выбрать такое значение потенциала, чтобы ток не лимитировался гетерогенным переносом электрона, даже если этот процесс необратим. При выполнении этого условия скоростьюопределяющей стадией может быть диффузия (массоперенос), адсорбция или химические реакции. Суммарный ток сенсора описывается следующим выражением:

$$\frac{1}{i_t} = \frac{1}{i_{id}} + \frac{1}{i_{ed}} + \frac{1}{i_{ct}} + \frac{1}{i_{ad}} + \frac{1}{i_k} + \dots \quad (11.1)$$

В него входят два диффузионных члена i_{id} и i_{ed} , которые определяются скоростями внутренней и внешней диффузии соответственно. Последний связан с диффузией в объеме раствора вплоть до электрода или границы раздела мембрана/раствор. Внутренняя диффузия включает движение соответствующих частиц в мембране или реакционном слое. Суммарный ток определяется также переносом заряда (i_{ct}) или адсорбцией реагирующих частиц на мембране или поверхности электрода (i_{ad}). Перемещение частиц определяемого вещества из раствора к сенсору может сочетаться с химической реакцией, протекающей с конечной скоростью (i_k). Следует, однако, подчеркнуть, что члены уравнения (11.1) не являются совершенно независимыми друг от друга.

11.2. Диффузия (массоперенос)

Хотя индикаторный электрод может иметь самую разнообразную геометрию, здесь мы остановимся лишь на плоской конфигурации. В случае, иллюстрируемом рис. 11.1, на плоский электрод наложен такой потенциал, что скорость восстановления вещества О на поверхности электрода контролируется диффузией. Концентрационный профиль,

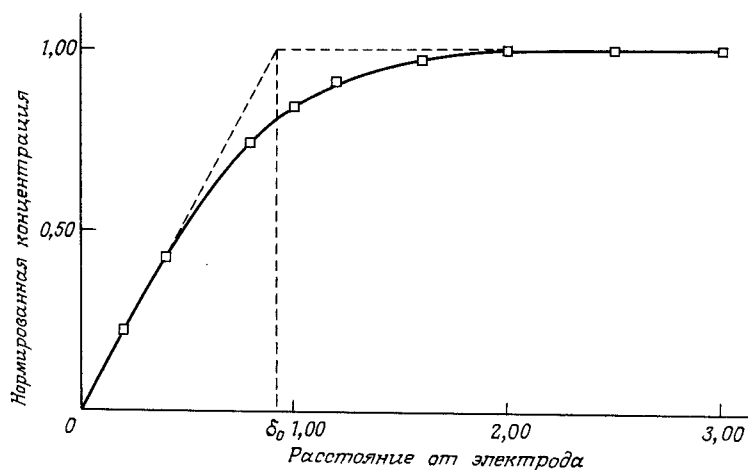


Рис. 11.1. Концентрационный профиль плоского электрода в условиях постоянства потенциала.

показанный на рис. 11.1, со временем может меняться. Его вид определяется как характером контролируемых колебаний потенциала электрода, так и массопереносом за счет диффузии или конвекции. Согласно первому закону Фика,

$$-J_0(x, t) = D_0 \frac{\partial C_0(x, t)}{\partial x}, \tag{11.2}$$

поток на поверхности электрода J , которому пропорционален ток, определяется наклоном градиента концентрации O в данной точке. Этот закон принципиально важен, поскольку в конечном итоге позволяет связать величину потока с концентрацией определяемого вещества в растворе.

В классической работе Левича [46] описаны течение раствора вдоль поверхности и потоки, возникающие вследствие диффузии и конвекции. Конфигурация вращающегося дискового электрода, по-видимому, изучена лучше других и безусловно наиболее полезна с теоретической точки зрения. Простой прием – увеличение скорости вращения электрода – приводит к возрастанию массопереноса и уменьшению толщины диффузионного слоя. Стационарный ток вращающегося электрода описывается выражением

$$i_L = 0,62nFAD_0^{2/3}\omega^{1/2}\nu^{-1/6}C_0^b, \tag{11.3}$$

где D – коэффициент диффузии; F – число Фарадея (94480 Кл/моль); A – площадь электрода; ω – скорость вращения, c^{-1} ; ν – кинематическая вязкость, $cm \cdot c^{-1}$; C_0^b – объемная концентрация раствора. Уравнение (11.3) можно переписать в виде

$$\frac{1}{i_T} = \frac{1}{i_N} + \frac{1}{i_L}. \tag{11.4}$$

Составляющими наблюдаемого тока i_T являются i_L – ток, зависящий от массопереноса и изменяющийся с изменением ω , и ток i_N , не зависящий от скорости вращения. График зависимости $1/i_T$ от $\omega^{-1/2}$ отсекает на оси ординат отрезок, равный $1/i_N$. Таким образом, при помощи вращающегося дискового электрода априори можно выделить составляющие i_N и i_L . Остается только определить физический смысл i_N . Этот подход широко используют при изучении электроактивных полимерных пленок [7].

В последнее время все больше внимания привлекает струйный электрод, теоретическое описание работы которого представлено в нескольких недавних публикациях [3,

16]. Потенциальными преимуществами этой гидродинамической конфигурации являются улучшение чувствительности, обусловленное большей эффективностью массопереноса, и уменьшение влияния характеристик подвижной фазы потока [31]. Этот метод используют в высокоэффективной жидкостной хроматографии [32] и при титровании белков бромом [6].

На практике для усиления массопереноса используют перемешивание раствора, что приводит к уменьшению толщины диффузионного слоя и повышению чувствительности. Но этот способ пригоден лишь при условии, что массоперенос можно регулировать воспроизводимо. Если на диффузию накладываются сопряженные кинетические или другие процессы, это может заметно влиять как на время отклика, так и на величину сигнала электрода. Этот вопрос мы обсудим дальше в связи с кинетикой процессов. Поскольку коэффициент диффузии D входит в выражение (11.2) для потока, очевидно, что результирующий ток, обуславливаемый электроактивными биологическими молекулами, будет зависеть от значения D . Для «больших» молекул, например с молекулярным весом 150 000, коэффициент диффузии обычно не менее чем в 100 раз меньше, чем для типичных «малых» молекул или ионов. Во многих электрохимических экспериментах D входит в выражение для тока с дробным показателем степени. Поэтому при прочих равных условиях токи для «больших» и «малых» молекул различаются не более чем в 10–20 раз. Наблюдаемые низкие токи для «больших» молекул объясняются диффузионными эффектами, хотя на самом деле они нередко контролируются другими кинетическими стадиями.

Амперометрические сенсоры часто защищают специальной мембраной, избирательно проницаемой для представляющих интерес частиц. Мембрана служит для изоляции электрода от биологической жидкости и удержания в тонком слое реагентов, например ферментов, необходимых для системы детектирования. С помощью мембраны можно устранить влияние белков, адсорбирующихся на электроде, на аналитические характеристики последнего. Кроме того, мембрана имеет еще две важные, хотя и не всегда должным образом оцениваемые функции. Во-первых, распределение частиц на границе раздела мембрана/раствор может приводить либо к ослаблению, либо к усилению сигнала. Это явление наблюдается помимо зарядовых или молекулярно-ситовых эффектов. Во-вторых, наличие мембраны относительно большой толщины (50–1000 мкм) создает дополнительный диффузионный барьер. В случае слишком толстой мембраны время отклика сенсора может заметно возрасти (до 5–10 мин). Однако такая мембрана имеет и преимущества, поскольку сигнал сенсора не зависит от движения (перемешивания) анализируемого раствора (внешнедиффузионный член уравнения (11.1) становится много больше внутридиффузионного).

В настоящее время свойства мембран, используемых для изготовления электрохимических сенсоров, вызывают значительный интерес. Традиционно скорость переноса частиц через мембрану измеряют, помещая ее между двумя перемешиваемыми растворами с разными концентрациями исследуемого вещества. Если известна толщина мембраны, то по результирующему потоку между двумя отделениями ячейки можно рассчитать коэффициент диффузии. Однако условия перемешивания далеко не всегда хорошо определены. Для изучения мембранного транспорта недавно был использован вращающийся дисковый электрод с нанесенной на него мембраной [28–30]. Вращая электрод с разной скоростью, можно изменять отношение скоростей внешней и внутренней диффузии (проницаемость). Стационарный поток через мембрану измеряют, проводя электролиз диффундирующих частиц на электроде, контактирующем с внутренней стороной мембраны. Тогда результирующий ток i_d определяется выражением

$$i_d = i_L \left[\frac{1}{1 + P_s/P_M} \right], \quad (11.5)$$

где i_L – ток в отсутствие мембраны. Сигнал определяется проницаемостями раствора $P_s = D/\delta$ и фазы мембраны $P_M = \alpha D_M/\delta_M$. Отношение этих величин P_s/P_M называется числом Био. Массоперенос в системе, таким образом, определяется коэффициентами диффузии в растворе и мембране, толщиной мембраны и коэффициентом распределения электроактивных частиц s между мембраной и раствором $\alpha = [s]_{\text{mem}}/[s]_{\text{sol}}$. В данном виде метод вращающегося диска применим только к электроактивным частицам, но в случае биосенсоров обычно именно такие частицы представляют интерес. В ряде работ показано, что электроды, покрытые отрицательно заряженной мембраной путем погружения в раствор полимера, например ацетилцеллюлозы [55, 62] или Nafion™ [25, 49], эффективно и избирательно задерживают анионные частицы. Это существенно облегчает детектирование пероксида водорода и положительно заряженных нейроактивных частиц на фоне высоких концентраций эндогенных солей аскорбиновой или мочевой кислот.

11.3. Гетерогенный перенос электрона

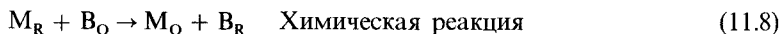
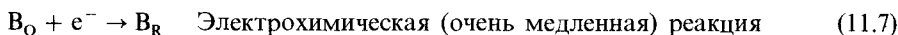
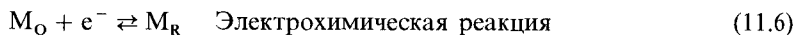
В последнее десятилетие достигнут значительный прогресс в использовании амперометрических методов для углубления представлений о свойствах и роли биологически важных веществ. К ним относятся низкомолекулярные вещества, такие как хиноны, катехоламины, пурины, флавины, тиолы и дисульфиды, а также белки, например цитохромы, ферредоксины и флавопротеины. Все эти вещества участвуют в биологически важных окислительно-восстановительных реакциях. Для более детального ознакомления с этим вопросом рекомендуем несколько монографий [19, 20]. В водном растворе с pH 7 имеется в диапазоне приложенных потенциалов «окно» приблизительно от +1,0 до –0,6 В (относительно нормального водородного электрода, н. в. э.), в котором концентрацию определяемого вещества можно контролировать электрохимически, если оно электроактивно при этих потенциалах. Основные проблемы при этом связаны с загрязнением электрода белками и образованием на его поверхности пленки из продукта (продуктов) реакции с переносом электрона. Значительный интерес представляет окисление восстановленного никотинамидадениндинуклеотида (NADH), служащего субстратом или кофактором во многих важных для анализа ферментативных реакциях. Электрохимическое окисление NADH протекает с трудом, причём образующийся продукт адсорбируется на электроде [11]. Для этой и других систем делались многочисленные попытки модифицировать электрод тепловой обработкой [57, 65], либо внедряя в поверхностный слой частицы металла [41, 64], либо адсорбируя на поверхности или прикрепляя к ней химический модификатор [58]. По-видимому, появление на поверхности функциональных кислородсодержащих групп облегчает перенос электрона. По данным Гортон и др. [27], адсорбция мелдолового голубого (7-диметиламино-1,2-бензфеноксазина) на графите способствует промежуточному переносу электрона вследствие образования комплекса с переносом заряда. При этом наблюдаются более низкие потенциалы окисления. Хотя для NADH и других систем получены обнадеживающие результаты, модифицированные электроды обычно недостаточно стабильны для использования их на практике. Тем не менее эта область исследований имеет большое значение для развития биосенсоров.

Ещё больше неясности в случае электроактивных белков. В обычных условиях подавляющее большинство белков не обнаруживает электроактивности, даже если известно, что в белковой молекуле имеются центры переноса электрона. Видимо, существуют три различных объяснения этого факта. Во-первых, белок может необратимо адсорбироваться на электроде, предотвращая таким образом дальнейший перенос электрона. Во-вторых, подход к электроактивному центру может быть стерически затруднен, что делает невозможным контакт с поверхностью электрода. И, в-третьих,

как отмечено выше, малые токи могут быть обусловлены низким коэффициентом диффузии макромолекул. Стратегия разработки методов прямого амперометрического определения белков должна быть нацелена на первые две проблемы.

Есть все основания считать, что в сильном ($10^4 - 10^5$ В/см) электрическом поле на границе электрод/раствор молекулярная структура белка — полиэлектролита существенно меняется, иногда вплоть до частичной или полной денатурации. Уменьшение заряда белка или поверхности электрода, очевидно, должно понижать энергию такого взаимодействия. Исходя из этих предположений, Армстронг и др. [8] добавляли Mg^{2+} в раствор ферредоксина из *Clostridium pasteurianum*, получая обратимую волну. По-видимому, образование ионных пар между Mg^{2+} и отрицательно заряженным белком понижает общий эффективный заряд молекулы. Аналогичные результаты получены для пластоцианина [9]. В 1979 г. группа исследователей из Оксфорда [22] показала, что электрод можно модифицировать, адсорбируя на нем 4,4'-дипиридил. На таком электроде цитохром *c* реагирует почти обратимо. В последующих работах [3] было показано, что адсорбция белка на электроде обязательно должна происходить раньше, чем перенос электрона. В данном случае адсорбция протекает быстро и обратимо, что, очевидно, связано с модификацией электрода дипиридилом. Сам дипиридил при потенциале восстановления белка неэлектроактивен. Еще одним примером может служить цитохром *c*₃ (из *Desulfovibrio vulgaris*) [35, 50, 51]. Этот четырехгемовый белок необратимо адсорбируется на «голом» электроде, модифицируя его таким образом, что перенос электрона становится быстрым и обратимым. Примеров быстрого непосредственного переноса электрона с участием белков известно немного. Поэтому использование медиаторов представляется наиболее перспективным подходом до тех пор, пока отсутствуют подходящие стабильные модифицированные электроды.

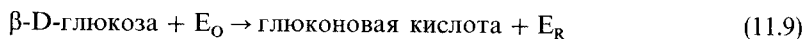
Несколько лет назад было установлено, что для сопряжения биологических редокс-пар с электродом можно использовать электрохимически генерируемые низкомолекулярные соединения [40, 59]. Медиатор служит для облегчения выгодного термодинамически, но затрудненного кинетически переноса электрона. Действие медиатора иллюстрирует следующая схема:



Здесь M_O , M_R и V_O , V_R — соответственно окисленные и восстановленные формы медиатора и биологического материала. Электрохимический процесс протекает при потенциале восстановления медиатора. При этом значении потенциала реакция (11.7) происходила бы и в отсутствие медиатора, если бы кинетика гетерогенного переноса электрона была более благоприятной. Поскольку в результате реакции (11.8) M_O генерируется вблизи поверхности электрода, ему не требуется диффундировать далеко, чтобы снова вступить в реакцию переноса электрона. Следовательно, в случае быстрой химической реакции значительное усиление тока может наблюдаться даже в присутствии небольшого количества V_O . Регистрируемый ток непосредственно связан с концентрацией V_O , что широко используют в электроаналитических методах. Реакции электрохимически генерированного M_R не слишком специфичны, поэтому недопустимо присутствие окислителей, которые могут конкурировать с V_O . В принципе медиатор можно иммобилизовать на поверхности электрода или удерживать в примыкающем к ней слое.

При разработке биосенсоров, особенно на основе катализируемых ферментами окислительно-восстановительных реакций, имеет смысл использовать электрод как своего рода кофактор. Примером может служить хорошо изученная система, содержа-

шая глюкозооксидазу:



где E_O , E_R и C_O , C_R — соответственно окисленная и восстановленная формы фермента и кофактора. В гомогенном растворе C_O — это обычно кислород, а C_R — пероксид водорода. Цель иммобилизации фермента в биосенсоре состоит, конечно, в том, чтобы получить амперометрический отклик, пропорциональный концентрации глюкозы. Чтобы это условие выполнялось, скорость всего процесса должна лимитироваться реакцией (11.9). Показано (Thévenot D. R., неопубликованные данные, 1985), что колебания уровня C_O (кислород) в окружающей среде могут существенно влиять на отклик сенсора при измерениях как *in vivo*, так и *in vitro*. Если бы белок E_R быстро окислялся непосредственно на электроде, то колебания концентрации кислорода не составляли бы проблемы. Хотя есть некоторые данные о том, что глюкозооксидаза окисляется на электроде [21, 38], в целом скорость этого процесса, по-видимому, не настолько высока и воспроизводима, чтобы использовать его в реальном приборе. Для облегчения переноса электрона между глюкозооксидазой и электродом авторы [44] впервые использовали в качестве электродного материала проводящую соль, образованную катионом N-метилфенилазиния (NMP^+) и анионом тетрацианохинодимертана ($TCNQ^-$). Недавно Элбери и др. [4, 5] продолжили эту работу, проведя опыты также с проводящими солями тетраафульвалена и хинолина с $TCNQ$. По данным этих авторов скорости гетерогенного переноса электрона в таких системах превышают $10^{-2} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$, а электроды стабильны не менее месяца. Это показывает, что перенос электрона происходит непосредственно, а не при помощи медиатора, как предполагали ранее [44]. Приведенные результаты являются решающим свидетельством в пользу того, что осуществим быстрый непосредственный перенос электрона с участием глюкозооксидазы. Возможно также промежуточное окисление E_R электрохимически генерируемым C_O по реакциям, аналогичным (11.9) и (11.10). Использование медиаторов в этих целях рассмотрено в этой книге (гл. 14–17).

11.4. Теория формирования амперометрического сигнала ферментного электрода

Для оптимизации работы электрода важно понять, какие факторы влияют на его стабильность, динамический диапазон и время отклика. Особое значение имеет кинетика реакций иммобилизованного фермента. В середине 70-х гг. развернулась дискуссия о влиянии иммобилизации на свойства фермента. Если каталитическая активность фермента высока, то вполне возможно, что скорость всей реакции лимитируется массопереносом к поверхности или слою, где находится катализатор. В литературе по химической технологии такую ситуацию характеризуют числом Дамколера

$$D_a = \frac{V_{\max}}{\left[\frac{D}{\delta} \right] K_M},$$

где V_{\max} — максимальная скорость гомогенной ферментативной реакции; K_M — константа Михаэлиса (предполагается, что ферментативная реакция подчиняется кинетическому закону Михаэлиса–Ментен). При $D_a \leq 0,1$ реакция контролируется каталитическим процессом; при $D_a \geq 10$ — массопереносом. В работе [54] мы показали, что можно использовать вращающийся дисковый электрод, чтобы различить эффекты, связанные с кинетикой и массопереносом, не меняя загрузку фермента. При скорости вращения

1600 об/мин график Лайнуивера–Бэка практически линеен; это означает, что сигнал контролируется кинетически при $D_a \approx 0,01$. При постоянной концентрации кислорода (в условиях насыщения раствора воздухом) значения K_M получаются близкими к значениям K_M для растворимого фермента. Ограничение в скорости массопереноса приводит к увеличению значений K_M , однако в соответствии с реакциями (11.9) и (11.10) повышенная концентрация кислорода также ведет к увеличению K_M для глюкозы. Эту взаимосвязь кинетики ферментативных процессов и концентраций потоков кислорода и глюкозы необходимо принимать во внимание. Роль кислорода как косубстрата анализируется в недавних теоретических работах [4, 47].

Если бы ферментный электрод функционировал в условиях кинетического контроля, концентрационная зависимость тока была бы нелинейной, и рабочий диапазон охватывал бы лишь концентрации в пределах одного порядка. Однако, как отмечено выше, в таких сенсорах между слоем фермента и анализируемым раствором находится мембрана. Она создает барьер для активных частиц, и отклик сенсора пропорционален диффузионному потоку, который не лимитируется кинетикой ферментативной реакции, пока активность фермента не становится слишком низкой. Вот почему отклик амперометрического электрода остается постоянным в течение продолжительного периода и затем внезапно падает. Как отмечалось в работе [36], сигнал сенсора не зависит от активности фермента, пока последняя достаточно высока. Однако активность фермента постепенно уменьшается и со временем достигает уровня, при котором отклик сенсора становится контролируемым кинетически и не является более постоянным. Более подробно теория ферментного электрода и свойства иммобилизованных ферментов обсуждаются в ряде публикаций [4, 14, 26, 47]. Идеальным был бы случай, когда используют тонкую мембрану, через которую кислород переносится лучше, чем глюкоза, и поэтому в реакционном слое он находится в избытке. Разработка мембран с такими особыми свойствами несомненно будет благоприятствовать развитию биосенсоров всех типов.

11.5. Электроды и их геометрия

В классических электрохимических работах по анализу биологических сред использовали ртутный капаящий электрод [13]. Однако в последние годы при разработке биосенсоров выбор пал на твердые электроды из Pt, Au и различных форм углерода. Основной проблемой при использовании твердых электродов является получение поверхностей с воспроизводимыми свойствами. Предварительная обработка электродов, включающая полировку, тепловую обработку и попеременное наложение на электрод нескольких различных потенциалов, способствует увеличению как воспроизводимости, так и величины сигнала электрода. Большинство «голых» электродов, однако, не дает воспроизводимого сигнала после продолжительной (в течение нескольких часов) выдержки в растворах белков. Чаще всего с помощью амперометрических биосенсоров определяют кислород, используя для этой цели электрод Кларка [15]. Пионерские работы Адамса [1, 2] послужили импульсом для развития методов контроля *in vivo* катехоламинов и других важных нейроактивных веществ. Электроды, регистрирующие сигналы нейротрансмиттеров в хвостатом ядре мозга крысы, должны не только обеспечивать быстрый отклик, но и быть настолько миниатюрными, чтобы было возможно пространственное разрешение исследуемых процессов. Уайтман и сотр. [37, 43] разработали ряд микроэлектродных датчиков из углеродного волокна и Pt или Au проволоки. Диаметр электродов составляет менее 0,5 мкм. Такая малая площадь поверхности электрода позволяет, как правило, измерять токи в наноамперном диапазоне. Поскольку отношение характеристической площади поверхности электрода к толщине диффузионного слоя мало, вольтамперометрический сигнал микро-

электродов существенно отличается от сигнала больших электродов. Поскольку измеряемые токи малы, эти электроды удобно использовать в циклической вольтамперометрии с высокими скоростями развертки (10^3 – 10^4 В/с). При введении в живую ткань такой электрод анализирует непосредственно окружающую его жидкость.

Другая исключительно важная конфигурация – это проточный амперометрический детектор. Наиболее часто используют устройство, состоящее из тонкослойной ячейки с плоским электродом из Pt, Au или стеклоуглерода. Противозлектрод и электрод сравнения располагают по течению потока. В этом случае сопротивление ячейки может быть довольно велико, но токи опять-таки лежат в наноамперном диапазоне, поэтому *IR*-потери обычно незначительны. Такую систему успешно и широко используют в качестве детектора в жидкостной хроматографии [42]; сообщалось о пределах обнаружения в несколько пикомолей [48]. Проведены фундаментальные исследования электродов этого типа с целью оптимизации их отклика [32, 63]. Проточные датчики используют прежде всего для отбора проб *in vitro*, часто в сочетании с очисткой и хроматографическим разделением пробы. Тевено и сотр. продемонстрировали применение такого ферментного электрода совместно с экстракорпоральным шунтом для контроля за концентрацией глюкозы в крови в масштабе реального времени (гл. 22). Обычно проточный детектор работает при постоянном потенциале, хотя в некоторых случаях возможен и сканирующий режим. Тонкослойный детектор представляет собой своего рода проточный реактор. Для селективного превращения или мониторинга частиц, исходно имеющихся в пробе или генерируемых электрохимически в детекторе, можно использовать комбинации электродов с различными потенциалами [53]. Сигнал детектора зависит от скорости потока, поэтому последнюю необходимо тщательно контролировать, особенно при низких пределах обнаружения. Работа насоса, прокачивающего раствор, вызывает периодические колебания уровня сигнала. При обычных скоростях потока электролизу подвергается 10–20% всего электрохимически активного материала, проходящего через детектор. Обычно это приводит к появлению острого пика, высоту или площадь которого можно использовать в расчетах при количественном определении веществ.

По чувствительности и селективности амперометрическое детектирование вполне соответствует требованиям иммуноанализа. Этот вопрос обсуждается в опубликованном недавно обзоре [34]. Прямое электрохимическое определение антитела обычно невозможно, поэтому к антителу или антигену (гаптenu) пришивают электрохимически активную метку. Чаще, однако, в иммуоферментном анализе находят активность фермента, определяя концентрацию в растворе электроактивного продукта катализируемой ферментом реакции. Поскольку в расчете на один моль фермента может получаться за разумное время по меньшей мере 10^3 – 10^4 моль продукта, имеет место своего рода усиление. Соответственно возможно определение концентраций на уровне ниже пикомоль. Описано применение данного метода для определения поверхностного антигена вируса гепатита В [12], кислого α_1 -гликопротеина [18] и фенитоина [24]. В работе [17] фемтомольные количества IgG определяли *in situ* в потоке через иммуноакторную систему с погрешностью $\pm 3\%$ менее чем за 30 мин.

Чувствительность иммуоферментного анализа существенно повышается, если располагать иммуносорбент как можно ближе к амперометрическому сенсору. К сожалению, большинство иммуохимических реакций имеют такие высокие константы равновесия, что трудно разрушить однажды образовавшийся комплекс антитело – антиген. Икарияма и сотр. [39] разработали удобную систему для вытеснения ферментной метки с электрода, покрытого мембраной, в результате чего высокоаффинная реакция протекает в растворе, а не на поверхности сенсора. Тем не менее иммуносенсорные поверхности, дающие быстрый и воспроизводимый отклик, встречаются довольно редко.

Многие биосенсоры работают при постоянном потенциале, что существенно упрощает приборное оформление. Однако при этом всегда наблюдается фоновый ток, величина которого может быть значимой при низких концентрациях определяемого вещества. Коррекция фонового тока и градуировка биосенсоров *in vivo* — две серьезные проблемы, которые требуют надежного решения. Колебания этих параметров могут быть обусловлены «отравлением» электрода компонентами среды. Ухудшается также чувствительность и время отклика биосенсора. Если флуктуации базовой линии обусловлены колебаниями концентраций эндогенных электроактивных мешающих частиц, то можно использовать двухэлектродную (дифференциальную) систему. Этот подход использовали при конструировании глюкозного датчика, где один электрод покрыт мембраной на основе глюкозооксидазы, а другой — мембраной, не содержащей фермента. Предполагается, что электроактивные примеси одинаковым образом диффундируют через обе мембраны [60]. В случаях, когда электрод загрязняется примесями из матрицы или продуктом электрохимической реакции, его подвергают многоимпульсной ступенчатой обработке при разных потенциалах [45, 52]. Этот способ позволяет одновременно провести как обработку электрода (в том числе удаление накопившихся на его поверхности пленок), так и установку базовой линии в области потенциалов, в которой отсутствует электролиз. Применяют также различные виды импульсной полярографии, вольтамперометрию (циклическую или с линейной разверткой потенциала). Последняя особенно полезна в двух случаях, описываемых ниже. Многие нейроактивные вещества окисляются при очень близких значениях потенциалов, и поэтому их трудно различить. Полная циклическая вольтамперограмма отражает различие в химических свойствах продуктов электролиза. Она может служить, с одной стороны, для качественного анализа, как «отпечаток пальца» исследуемой системы [56], а с другой — для количественного описания протекающих в ней электрохимических процессов. Недавно было показано [61], что представляющие интерес для биологии органические молекулы могут концентрироваться на обработанной поверхности электрода. При линейной развертке потенциала осадок определяемого вещества удаляется с поверхности, давая четко выраженный пик.

Амперометрия является перспективным направлением развития биосенсоров для применения как *in vivo*, так и *in vitro*. Широкий динамический диапазон концентраций ($10^4 - 10^5$) позволяет более широко применять ее на практике, чем потенциометрическое детектирование. Проблема заключается лишь в эффективном сопряжении специфических биохимических реакций с процессами, обуславливающими отклик электрода. Такие сенсоры могут функционировать в исключительно неоднородной среде и (в случае имплантируемых сенсоров) при температуре 37 °С.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adams R. N. *Electrochemistry at solid electrodes*. Marcel Dekker, New York, 1976.
2. Adams R. N. Probing brain chemistry with electroanalytical techniques. *Anal. Chem.*, **48**, 1126A–1138A (1976).
3. Albery W. J. The current distribution on a wall-jet electrode. *J. Electroanal. Chem.*, **191**, 1–13 (1985).
4. Albery W. J., Bartlett P. N. Amperometric enzyme electrodes. Part I. Theory. *J. Electroanal. Chem.*, **194**, 211–22 (1985).
5. Albery W. J., Cranston D. H. Amperometric enzyme electrodes. Part II. Conducting salts as electrode materials for the oxidation of glucose oxidase. *J. Electroanal. Chem.*, **194**, 223–35 (1985).
6. Albery W. J., Svanberg L. R., Wood P. The estimation and identification of proteins by ring-disc titration. Part II. Application to liquid Chromatography. *J. Electroanal. Chem.*, **162**, 45–53 (1984).
7. Andrieux C. P., Dumas-Bouchiat J. M., Saveant J. M. Kinetics of electrochemical reactions mediated by redox polymer films. *J. Electroanal. Chem.*, **169**, 9–21 (1984).
8. Armstrong F. A., Hill H. A. O., Walton N. J. Direct electrochemical reduction of ferredoxin promoted by Mg^{2+} . *FEBS Lett.*, **145**, 241–4 (1982).
9. Armstrong F. A., Oliver B. N., Whitford D. Direct electrochemistry of the photosynthetic blue copper

- protein plastocyanin. Electrostatic promotion of rapid charge transfer at an edge-oriental pyrolytic graphite electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 1473–6 (1985).
10. *Bard A.J., Faulkner L.R.* Electrochemical Methods. Wiley, New York, 1980.
 11. *Blankespoor R.L., Miller L.L.* Electrochemical oxidation of NADH kinetic control by product inhibition and surface coating. *J. Electroanal. Chem.*, **171**, 231–41 (1984).
 12. *Boitieux J.L., Thomas D., Desmet G.* Oxygen electrode-based enzyme immunoassay for the Amperometric determination of hepatitis B surface antigen. *Anal. Chim. Acta*, **163**, 309–13 (1984).
 13. *Brezina M., Zuman P.* Polarography in medicine, biochemistry and pharmacy. Interscience, New York, 1958.
 14. *Carr P.W., Bowers L.D.* Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry. Wiley, New York, 1980.
 15. *Clark L.C., Lyons C.* Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **102**, 29–45 (1962).
 16. *Dalhuisen A.J., van der Meer Th.H., Hoogendoorn C.J., van Bennekom W.P.* Hydrodynamic properties and mass transfer characteristics of electrochemical flow-through cells of the confined wall-jet type. *J. Electroanal. Chem.*, **182**, 295–313 (1985).
 17. *De Alwis W.U., Wilson G.S.* Rapid sub-picomole electrochemical enzyme immunoassay for immunoglobulin G. *Anal. Chem.*, **57**, 2754–56 (1985).
 18. *Doyle M.J., Halsall H.B., Heineman W.R.* Enzyme linked immunosorbent assay with electrochemical detection for α_1 -acid glycoprotein. *Anal. Chem.*, **56**, 2355–60 (1984).
 19. *Dryhurst G.* Electrochemistry of biological molecules. Academic Press, New York, 1977.
 20. *Dryhurst G., Kadish K.M., Scheller F., Renneberg R.* Biological electrochemistry. Vol. I. Academic Press, New York, 1982.
 21. *Durliat H., Comtat M.* Amperometric enzyme electrode for the determination of glucose based on thin-layer spectroelectrochemistry of glucose oxidase. *Anal. Chem.*, **56**, 148–52 (1984).
 22. *Eddowes M.J., Hill H.A.O.* Electrochemistry of horse heart cytochrome *c*. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 4461–4464 (1979).
 23. *Eddowes M.J., Albery W.J., Hill H.A.O., Hillman A.R.* Mechanism of the reduction and oxidation reaction of cytochrome *c* at a modified gold electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3904–3910 (1981).
 24. *Eggers H.M., Halsall H.B., Heineman W.R.* Enzyme immunoassay with flow amperometric detection of NADH. *Clin. Chem.*, **28**, 1848–51 (1982).
 25. *Gerhardt G.A., Oke A.F., Nagy G., Moghaddem B., Adams R.N.* Nafion-coated electrodes with high selectivity for CNS electrochemistry. *Brain Res.*, **290**, 390–95 (1984).
 26. *Goldstein L.* Kinetic behaviour of immobilized enzyme systems. *Meth. Enzymol.*, **44**, 397–450 (1976).
 27. *Gorton L., Torstensson A., Jaegfeldt H., Johansson G.* Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzymes by graphite electrodes modified with an adsorbed phenoxazinium salt, meldola blue. *J. Electroanal. Chem.*, **161**, 103–20 (1984).
 28. *Gough D.A., Leyboldt J.K.* Membrane-covered, rotated disk electrode. *Anal. Chem.*, **51**, 439–44 (1979).
 29. *Gough D.A.* Rotated, membrane covered oxygen electrode. *Anal. Chem.*, **52**, 1126–30 (1980).
 30. *Gough D.A.* Transient studies of glucose, oxygen and hydroquinone at a membrane-covered rotated disk electrode. *J. Electrochem. Soc.*, **127**, 1279–86 (1980).
 31. *Gunasingham H.* Large volume wall-jet cells as electrochemical detectors for high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta*, **139**, 139–47 (1984).
 32. *Gunasingham H., Fleet B.* Wall-jet electrode in continuous monitoring voltammetry. *Anal. Chem.*, **55**, 1409–14 (1983).
 33. *Gunasingham H., Tay B.T., Ang K.P.* The electrolytic efficiency of amperometric detection on normal phase HPLC. *Anal. Chim. Acta*, **176**, 143–50 (1985).
 34. *Heineman W.R., Halsall H.B.* Strategies of electrochemical immunoassay. *Anal. Chem.*, **57**, 1321–31a (1985).
 35. *Hinnen C., Parsons R., Niki K.* Electrochemical and spectroreflectance studies of adsorbed horse heart cytochrome *c* and cytochrome c_3 (*D. vulgaris*, Miyazaki strain) at a gold electrode. *J. Electroanal. Chem.*, **147**, 329–337 (1983).
 36. *Horvath C., Engasser J.M.* External and internal diffusion in heterogeneous enzyme systems. *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 909–23 (1974).
 37. *Howell J.O., Wightman R.M.* Ultrafast voltammetry and voltammetry in highly resistive solutions with microvoltammetric electrodes. *Anal. Chem.*, **56**, 524–9 (1984).
 38. *Ianniello R.M., Lindsay T.J., Yacynych A.M.* Differential pulse voltammetric study of direct electron transfer at glucose oxidase chemically modified graphite electrodes. *Anal. Chem.*, **54**, 1098–1101 (1982).
 39. *Ikariyama Y., Kunoh H., Aizawa M.* Sensitive bioaffinity sensor with metastable molecular complex receptor and enzyme amplifier. *Anal. Chem.*, **57**, 496–500 (1985).

40. Ito M., Kuwana T. Spectroelectrochemical study of indirect reduction of triphosphopyridine nucleotide. *J. Electroanal. Chem.*, **32**, 415–25 (1971).
41. Kao W.H., Kuwana T. Electrocatalysis of electrodeposited spherical Pt microparticles dispersed in a polymeric film electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 473–6 (1984).
42. Krull I.S., Bratin K., Shoup R.E., Kissinger P.T., Blank C.C. LCEC for trace analysis: recent advances in instrumentation, methods and applications. *Am. Lab.*, **15**, 57–65 (1983).
43. Kovach P.M., Caudill W.L., Peters D.G., Wightman R.M. Faradaic electrochemistry at microcylinder, band and tubular band electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **185**, 285–95 (1985).
44. Kulys J.J., Samaline A.S., Svirnickas G.J.S. Electron exchange between the enzyme active center and organic metal. *FEBS Lett.*, **114**, 7–10 (1980).
45. Lane R.F., Hubbard A.T. Differential double pulse voltammetry at chemically modified platinum electrodes for *in vitro* determination of catecholamines. *Anal. Chem.*, **48**, 1287–93 (1976).
46. Levich V.G. Physicochemical hydrodynamics. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., USA, 1962.
47. Leyboldt J.K., Gough D.A. Model of a two-substrate enzyme electrode for glucose. *Anal. Chem.*, **56**, 2896–2904 (1984).
48. Lin P.Y.T., Bulawa M.C., Wong P., Lin L., Scott J., Blank C.L. The determination of catecholamines, indoleamines, metabolites, and related activities using three micron liquid chromatography columns. *J. Liq. Chrom.*, **7**, 509–38 (1984).
49. Nagy G., Gerhardt G.A., Oke A.F., Rice M.E., Adams R.N., Moore R.B., III, Szentirmay M.N., Martin C.R. Ion exchange and transport of neurotransmitters in nafion films on conventional and microelectrode surfaces. *J. Electroanal. Chem.*, **188**, 85–94 (1985).
50. Niki K., Yagi T., Inokuchi H., Kimura K. Electrochemical behaviour of cytochrome *c*₃ of *Desulfovibrio vulgaris*. Strain Miyazaki, on the mercury electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 3335–40 (1979).
51. Niki K., Kobayashi Y., Matsuda H. Determination of macroscopic standard potentials of a molecule with a reversible *n*-consecutive one electron transfer process. *J. Electroanal. Chem.*, **178**, 333–41 (1984).
52. Polta J.A., Johnson D.C. The direct electrochemical detection of amino acids at a platinum electrode in an alkaline chromatographic effluent. *J. Liq. Chromatogr.*, **6**, 1727–43 (1983).
53. Roston D.A., Kissinger P.T. Series dual electrode detector for liquid chromatography/electrochemistry. *Anal. Chem.*, **54**, 429–34 (1982).
54. Shu F.R., Wilson G.S. Rotating ring-disk electrode for surface catalysis studies. *Anal. Chem.*, **48**, 1679–1686 (1976).
55. Sittampalam G., Wilson G.S. Surface modified electrochemical detector for liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **55**, 1608–10 (1983).
56. Stamford J.A., Kruk Z.L., Millar J., Wightman R.M. Striatal dopamine uptake in the rat: *In-vivo* analysis by fast cyclic voltammetry. *Neurosci. Lett.*, **51**, 133–8 (1984).
57. Stutts K.J., Kovach P.M., Kuhr W.G., Wightman R.M. Enhanced electrochemical reversibility at heat-treated glassy carbon electrodes. *Anal. Chem.*, **55**, 1632–4 (1983).
58. Stutts K.J., Wightman R.M. Electroanalysis of ascorbate oxidation with electrosynthesized surface-bound mediators. *Anal. Chem.*, **55**, 1576–9 (1983).
59. Swartz D.B., Wilson G.S. Small-volume coulometric redoxostat. *Anal. Biochem.*, **40**, 392–400 (1971).
60. Thévenot D.R., Sternberg R., Coulet P.R., Laurent J., Gautheron D.C. Enzyme collagen membrane for electrochemical determination of glucose. *Anal. Chem.*, **51**, 96–100 (1979).
61. Wang J., Freiha B.A. Extractive preconcentration of organic compounds at carbon paste electrode. *Anal. Chem.*, **56**, 849–52 (1984).
62. Wang J., Hutchins L.D. Thin-layer electrochemical detector with a glassy carbon electrode coated with a base-hydrolyzed cellulosic film. *Anal. Chem.*, **57**, 1536–41 (1985).
63. Weber S.G. The dependence of current on flow rate in thin-layer electrochemical detectors used in liquid chromatography. *J. Electroanal. Chem.*, **145**, 1–7 (1983).
64. Weisshaar D.E., Kuwana T. Electrodeposition of metal micro-particles in a polymer film on a glassy carbon electrode. *J. Electroanal. Chem.*, **163**, 395–9 (1984).
65. Wightman R.M., Deakin M.R., Kovach P.M., Kuhr W.G., Stutts K.J. Methods to improve electrochemical reversibility at carbon electrodes. *J. Electrochem. Soc.*, **131**, 1578–83 (1984).

Глава 12

Амперометрические ферментные электроды: теория и эксперимент

У. Джон Элбери, Дерек Х. Крэстон

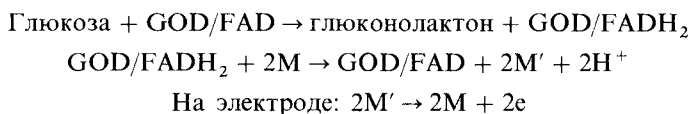
12.1. Введение

Амперометрические ферментные электроды позволяют объединить способность фермента к специфическому распознаванию определенных молекул-«мишеней» и возможность прямого электромеханического преобразования скорости реакции в электрический ток. В основу работы ферментных электродов первого поколения, например глюкозного электрода (гл. 1, а также [15, 17]), была положена природная ферментативная реакция



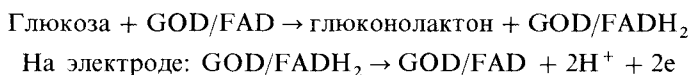
где GOD – глюкозооксидаза [EC 1.1.3.4]. Электрод используют только для определения концентрации либо исходного субстрата O_2 , либо продукта реакции H_2O_2 . Это довольно сложное устройство с двумя мембранами; кроме того, его сигнал зависит от концентрации O_2 в окружающей среде.

Позже были разработаны системы второго поколения (гл. 15 и 16), а также [12, 13]). Химизм протекающих в них реакций таков: фермент вступает в окислительно-восстановительную реакцию с субстратом, но затем вновь окисляется медиатором (не кислородом), а медиатор в свою очередь окисляется на электроде:



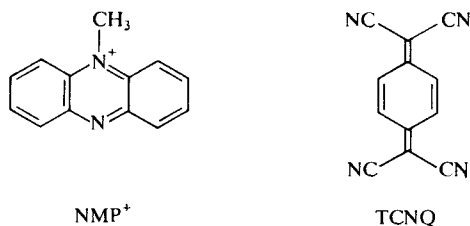
В этой схеме FAD представляет собой флавиновый редокс-центр глюкозооксидазы, M – медиатор; предполагается, что M/M' – одноэлектронная пара. В работах [12, 13] показано, что эффективными медиаторами могут служить пары ферроцен/ферроциний, а также такие вещества, как $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ и катион N-метилфеназиния (NMP^+).

Известен и более простой и к тому же прямой способ, не требующий медиатора, но для этого необходим такой материал электрода, на котором может непосредственно окисляться восстановленный фермент:



Эта схема реакции является самой простой из всех возможных. Она использована в приборах третьего поколения, описанных в недавно опубликованных работах [2, 7]. Кулис и сотр. [14, 22] установили, что для окисления фермента можно использовать

органические проводящие соли типа $\text{NMP}^+ \text{TCNQ}^-$ (см. также гл. 15):



При разработке ферментных электродов важно идентифицировать скоростьопределяющую стадию, от которой зависит эффективность работы всего прибора. Такой стадией может быть перенос субстрата через мембрану, реакция его с ферментом, перенос продукта реакции обратно через мембрану или регенерация фермента. Исходя из этого, мы начали с разработки модели ферментного электрода. Поскольку в основе электродов третьего поколения лежит самая простая схема реакций, мы построили модель электрода именно этого типа (к тому же так удастся избежать излишних математических вычислений). Затем этот подход можно распространить на электроды второго поколения. Ниже также показано, как определить лимитирующую стадию по экспериментальным данным.

12.2. Модель ферментного электрода

На рис. 12.1 схематически показано устройство ферментного электрода третьего поколения. Что касается кинетики ферментативной реакции, мы исходили из предположения, что в реакции участвует один субстрат, один продукт и фермент. При этом фермент E превращает субстрат S в продукт P , а сам превращается в E' :

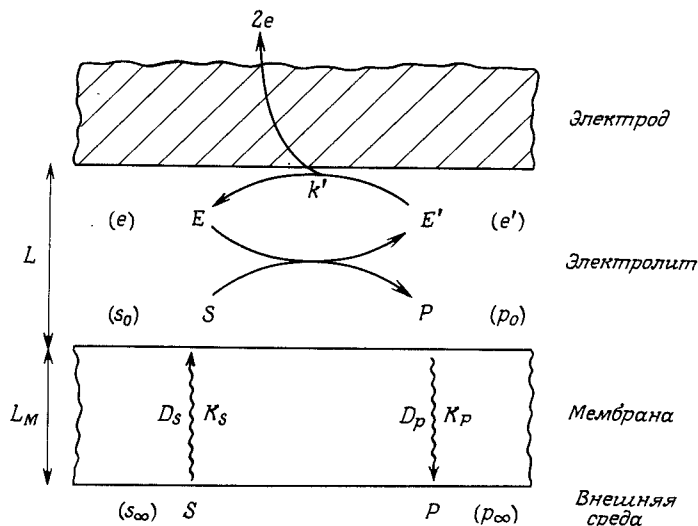
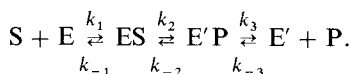


Рис. 12.1. Схематическое изображение ферментного электрода.

Для каждой стадии в этой схеме можно записать

$$K_n = k_n/k_{-n}$$

и

$$K_{TD} = K_1 K_2 K_3,$$

где K_{TD} описывает суммарное равновесие между $S + E$ и $P + E'$.

Перенос S и P через мембрану описывается константами скоростей массопереноса [1] k'_S и k'_P (в общем виде k'_X , где X —либо S , либо P):

$$k'_X = D_X K_X / L_M.$$

Здесь D_X —коэффициент диффузии; K_X —коэффициент распределения X в мембране; L_M —толщина мембраны. Предполагается, что электродная реакция, описываемая константой k' , является необратимой. Все константы скоростей с индексом $'$ относятся к гетерогенным реакциям и выражаются обычно в $\text{см} \cdot \text{с}^{-1}$. Строчными буквами обозначены концентрации различных частиц, причем для S и P индексы ∞ и 0 обозначают концентрации с наружной и внутренней стороны мембраны соответственно. Мы полагаем, что слой электролита за мембраной настолько тонок (толщиной в несколько микрон), что в нем отсутствует концентрационная поляризация. На практике именно этот случай встречается чаще всего. Эффекты концентрационной поляризации рассмотрены нами ранее [3].

12.3. Уравнение стационарного состояния

В стационарном состоянии поток j (обычно выраженный в моль $\cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) можно записать следующим образом:

$$j = k'_S (s_\infty - s_0) \quad (12.1)$$

$$= L [k_1 s_0 e - k_{-1} es] \quad (12.2)$$

$$= L [k_2 es - k_{-2} e' p] \quad (12.3)$$

$$= L [k_3 e' p - k_{-3} p_\infty e'] \quad (12.4)$$

$$= k'_P (p_0 - p_\infty) \quad (12.5)$$

$$= k' e'. \quad (12.6)$$

Общую концентрацию фермента e_Σ можно выразить как

$$e_\Sigma = e + es + e' p + e'. \quad (12.7)$$

Исключая из уравнений (12.1)–(12.7) шесть неизвестных (s_0 , p_0 и четыре концентрации фермента), получаем

$$\begin{aligned} \frac{e_\Sigma}{j} = & \left\{ 1 - \frac{j}{k'_S s_\infty} \right\} \left\{ \frac{1}{L k_{\text{кат}}} + \frac{1}{k'} + \frac{K_3^{-1} (1 + K_2^{-1})}{k'} \left[p_\infty + \frac{j}{k'_P} \right] \right\} \\ & + \frac{1}{s_\infty} \left\{ \frac{K_M}{L k_{\text{кат}}} + \frac{K_1^{-1} K_2^{-1} K_3^{-1}}{k'} \left[p_\infty + \frac{j}{k'_P} \right] \right\} + \frac{e_\Sigma}{k'_S s_\infty}, \end{aligned} \quad (12.8)$$

где

$$\frac{1}{k_{\text{кат}}} = \frac{1}{k_2} + \frac{1}{K_2 k_3} + \frac{1}{k_3} \quad (12.9)$$

и

$$\frac{K_M}{k_{\text{кат}}} = \frac{1}{k_1} + \frac{1}{K_1 k_2} + \frac{1}{K_1 K_2 k_3}. \quad (12.10)$$

Выражения для $k_{\text{кат}}$ и $K_M/k_{\text{кат}}$ обсуждались в работе [6]. На диаграмме, приведенной на рис. 12.2, показан вклад каждого члена в уравнениях (12.8) и (12.10) в возможное изменение свободной энергии на всех стадиях процесса. Благодаря тому, что почти все константы равновесия и скорости отдельных процессов входят в уравнения (12.8)–(12.10) в виде обратных величин, оказывается возможным выделить различные лимитирующие скорость процессы [6]. Ниже обсуждаются отдельные члены уравнения (12.8).

Во-первых, имеется два члена, включающие L . Они могут доминировать, только если лимитирующим процессом является ферментативная реакция. Первый из этих членов, включающий $k_{\text{кат}}$, соответствует насыщению фермента, а второй член с

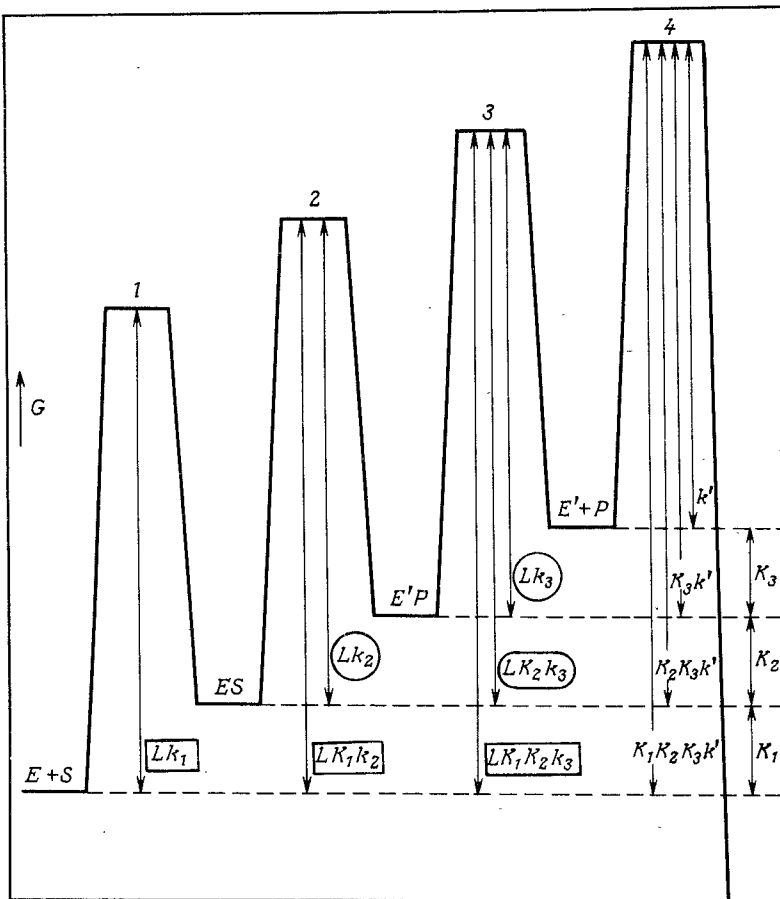


Рис. 12.2. Схематическая диаграмма, показывающая разности свободных энергий, которые соответствуют каждому из десяти лимитирующих членов уравнений (12.8)–(12.10). Три члена, составляющие $k_{\text{кат}}$ [уравнение (12.9)], обведены кружками, а три члена, составляющие $k_{\text{кат}}/K_M$ [уравнение (12.10)], – прямоугольниками. Комбинация четырех констант в нижнем ряду (реакция $E+S$) составляет член s_x в уравнении (12.8). Остальные комбинации констант входят в первый член уравнения (12.8).

$K_M/k_{\text{кат}}$ – ненасыщенному ферменту. Если поток j становится близок к пределу, ограничиваемому транспортом через мембрану ($j \approx k'_s s_\infty$), то вследствие концентрационной поляризации раствор фермента с внутренней стороны мембраны является менее насыщенным, чем можно ожидать, исходя из внешней концентрации s_∞ . Этот эффект описывается выражением в первой скобке, которое уменьшает значение члена с $k_{\text{кат}}$.

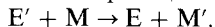
Во-вторых, простой член k'^{-1} будет определяющим, если процесс лимитируется кинетикой электродной реакции и почти весь фермент превращается в E' . Эти условия выполняются, если электрохимические процессы протекают медленно и отсутствует ингибирование фермента продуктом реакции. Константа скорости k' входит в то же выражение в скобках, что и произведение $Lk_{\text{кат}}$, поскольку в любом случае скорость-определяющая стадия включает оборот фермента.

В-третьих, два других члена уравнения, включающих k' , также относятся к случаям, в которых лимитирующей является кинетика электродных процессов. Первый член в скобках описывает ситуацию, когда большая часть фермента находится в форме ES либо $E'P$, а второй – когда фермент присутствует в основном в виде E и, следовательно, для его превращения в E' требуется субстрат S . Оба этих члена тем больше, чем выше концентрация продукта P позади мембраны, что может быть связано либо с высокой внешней концентрацией p_∞ , либо с медленным переносом через мембрану генерируемого в реакционной зоне продукта (член j/k'_P). Ингибирование процесса продуктом возникает вследствие того, что при превращении из E , ES или $E'P$ в E' и далее в переходное состояние на электроде (скоростьопределяющая стадия) продукт P должен высвободиться. Это не относится к описываемому простым выражением k'^{-1} случаю, когда фермент находится в основном в форме E' .

Наконец, рассмотрим последний член в правой части уравнения (12.8). Он будет доминирующим, если процесс лимитируется стадией транспорта S через мембрану. При этих условиях поток j не зависит от концентрации фермента; скорости как ферментативной, так и электродной реакций достаточно высоки, чтобы субстрат S расходовался сразу после прохождения мембраны.

12.4. Электроды второго поколения

Обратимся теперь к электродам второго поколения. В этих электродах фермент E' регенерируется преимущественно путем реакции с медиатором M , а не прямой реакции на электроде. В некоторых случаях медиатор иммобилизуют на поверхности электрода. Тогда константа скорости k' в приведенной выше схеме реакции характеризует просто гетерогенную реакцию фермента с иммобилизованным медиатором. Следовательно, применим тот же теоретический подход. В другом варианте медиатор присутствует в растворе электролита. Тогда в рассматриваемой схеме реакцию с константой скорости k' следует заменить гомогенной реакцией E' с M :

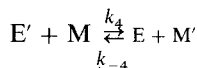


В большинстве случаев концентрация M достаточно велика, чтобы при функционировании электрода оставаться практически постоянной. Следовательно, в уравнении (12.8) мы можем заменить k' на эквивалентную константу скорости $Lk_4 m$, описывающую регенерацию фермента:

$$\frac{e_\Sigma}{j} = \left\{ 1 - \frac{j}{k'_s s_\infty} \right\} \left\{ \frac{1}{Lk_{\text{кат}}} + \frac{1}{Lk_4 m} + \frac{K_3^{-1}(1 + K_2^{-1})}{Lk_4 m} \left[p_\infty + \frac{j}{k'_P} \right] \right\} + \frac{1}{s_\infty} \left\{ \frac{K_M}{Lk_{\text{кат}}} + \frac{K_1^{-1} K_2^{-1} K_3^{-1}}{Lk_4 m} \left[p_\infty + \frac{j}{k'_P} \right] \right\} + \frac{e_\Sigma}{k'_s s_\infty} \quad (12.11)$$

Анализ различных членов этого уравнения аналогичен анализу уравнения (12.8).

Рассматривая электроды второго поколения, следовало бы учесть обратную реакцию с константой скорости k_{-4} и электрохимическую регенерацию медиатора:



На электроде: $M' \xrightarrow{k} M$.

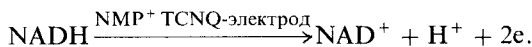
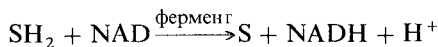
Однако, рассматривая реакции M' , необходимо иметь в виду следующее: для того, чтобы свободная энергия переходного состояния с константой k' была выше, чем для состояния с константой k_4 , должно выполняться условие

$$k' < Lk_{-4}e. \quad (12.12)$$

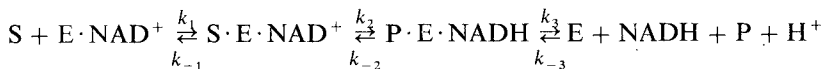
Поскольку k' описывает регулируемое электродным потенциалом электрохимическую реакцию медиатора, молекулы которого невелики, можно полагать, что $k' > 0,1 \text{ см} \times \text{с}^{-1}$. При типичных значениях $L \sim 10^{-2} \text{ см}$ и $e \sim 10^{-4} \text{ моль/дм}^3$ неравенство (12.12) выполняется только при значениях k_{-4} , больших $10^5 \text{ дм}^3 \text{ моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$. Значения k_{-4} приводятся редко, но они могут быть рассчитаны из известных значений k_4 и разностей стандартных потенциалов восстановления фермента и медиатора соответственно. Найдено, что даже если скорость прямой реакции контролируется диффузией ($\sim 10^9 \text{ дм}^3 \text{ моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$), при разности значений E^0 , превышающей 250 мВ, k_{-4} меньше $10^5 \text{ дм}^3 \text{ моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$. В действительности значения k_4 еще меньше; кроме того, обычно выбирают медиаторы, достаточно отличающиеся от фермента по величине E^0 , чтобы реакция протекала полностью до конца. Поэтому мы вряд ли сможем найти пример, где реакционную схему пришлось бы усложнить. Это позволяет также обойтись без громоздких математических выражений.

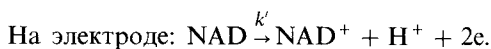
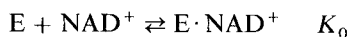
12.5. NADH-электроды

Система NAD^+/NADH поистине универсальна — она служит кофактором более 250 ферментов. NADH эффективно окисляется на электродах, изготовленных на основе проводящих органических солей [2, 21]. Эти данные позволили приступить к разработке семейства электродов второго поколения, в которых реакция с участием фермента сопровождается регенерацией NAD^+ путем окисления NADH (гл. 15). В присутствии субстрата SH_2 в системе протекают следующие реакции:



При более детальном описании кинетики ферментативного процесса мы исходили из модели типа один субстрат — фермент — один продукт, согласно которой субстрат S превращается в продукт P с использованием кофактора NAD^+/NADH . Мы полагаем, что NAD^+ присутствует в достаточном количестве и, следовательно, концентрация свободного фермента E много меньше концентрации фермента, связанного с NAD^+ ($E \cdot \text{NAD}^+$). Положим также, что связывание фермента с NAD^+ происходит достаточно быстро и между E и $E \cdot \text{NAD}^+$ устанавливается равновесие с константой K_0 :





Для этой схемы имеем

$$K_{TD} = K_0 K_1 K_2 K_3,$$

где K_{TD} описывает суммарное равновесие между $S + NAD^+$ и $P + NADH + H^+$.

С помощью рассуждений, аналогичных приведенным выше, получаем следующее выражение для j :

$$\begin{aligned} \frac{e_{\Sigma}}{j} = & \frac{1}{Lk_{\text{кат}}} \left[1 - \frac{j}{k'_S s_{\infty}} \right] + \frac{K_M}{Lk_{\text{кат}} s_{\infty}} + \frac{je_{\Sigma}}{k'_P k' K_{TD} s_{\infty} [NAD^+]} + \\ & + \frac{j^2}{Lk'_P k' K_{TD} s_{\infty} [NAD^+]} \left[\frac{1}{k_{-1}} + \frac{K_2}{k_{-1}} + \frac{1}{k_{-2}} \right] + \frac{e_{\Sigma}}{k'_S s_{\infty}}. \end{aligned} \quad (12.13)$$

Чтобы упростить это выражение, предположим, что внешняя концентрация продукта p_{∞} равна нулю. Сопоставив уравнения (12.13) и (12.8), видим, что они содержат одни и те же члены $k_{\text{кат}}$ и $K_M/k_{\text{кат}}$, характеризующие кинетику ферментативной реакции, и k'_S , описывающий транспорт субстрата. Это и неудивительно, поскольку обе схемы реакций идентичны вплоть до момента высвобождения продукта P. В схеме для электрода третьего поколения реакция на электроде (с константой k') является одним из переходных состояний, через которые фермент проходит в каждом цикле. Поэтому члены, содержащие k' в уравнении (12.8), описывают как бы дополнительное переходное состояние в насыщенной и ненасыщенной частях выражения (12.13). В NADH-электроде фермент E при освобождении регенерирует путем быстрого связывания NAD^+ . Однако скорость этого процесса может лимитироваться электрохимическим превращением NADH. Если в уравнении (12.13) доминирующим является третий член, то концентрация фермента сокращается и поток j не зависит от толщины слоя электролита L . Учитывая, что концентрация продукта P задается отношением j/k'_P , получаем простое выражение для потока:

$$j \approx k' [NADH]_{eq},$$

где $[NADH]_{eq}$ — равновесная концентрация NADH для данных концентраций субстрата, продукта и NAD^+ . В этих условиях ферментная система быстро приходит в равновесие, причем скорость этого процесса лимитируется электрохимическим превращением NADH.

Что можно сказать о последнем, четвертом члене уравнения (12.13)? На первый взгляд он представляется довольно странным. В него входят три выражения, характеризующие кинетику как ферментативного, так и электрохимического процессов, причем каждый компонент, по-видимому, зависит от константы скорости обратного процесса. Фактически этот член описывает весь цикл превращения фермента. В схеме для электрода третьего поколения мы полагали, что электрохимическая стадия с константой скорости k' необратима, так что каждый цикл превращения фермента отчетливо отделен стадией с k' . В рассматриваемой же схеме фермент не подвергается необратимому превращению, а на электроде разлагается NADH. Таким образом, теперь нет необходимости в допущении, что каждый ферментный цикл начинается и заканчивается $E \cdot NAD^+$. Мы должны объединить все циклы в непрерывную последовательность и затем найти среди них стадию с наибольшим барьером. Учитывая, что, как и прежде, $p = j/k'_P$ и $[NADH] = j/k'$, мы можем интерпретировать четвертый член уравнения (12.13), как показано на диаграмме свободной энергии (рис. 12.3). В этом

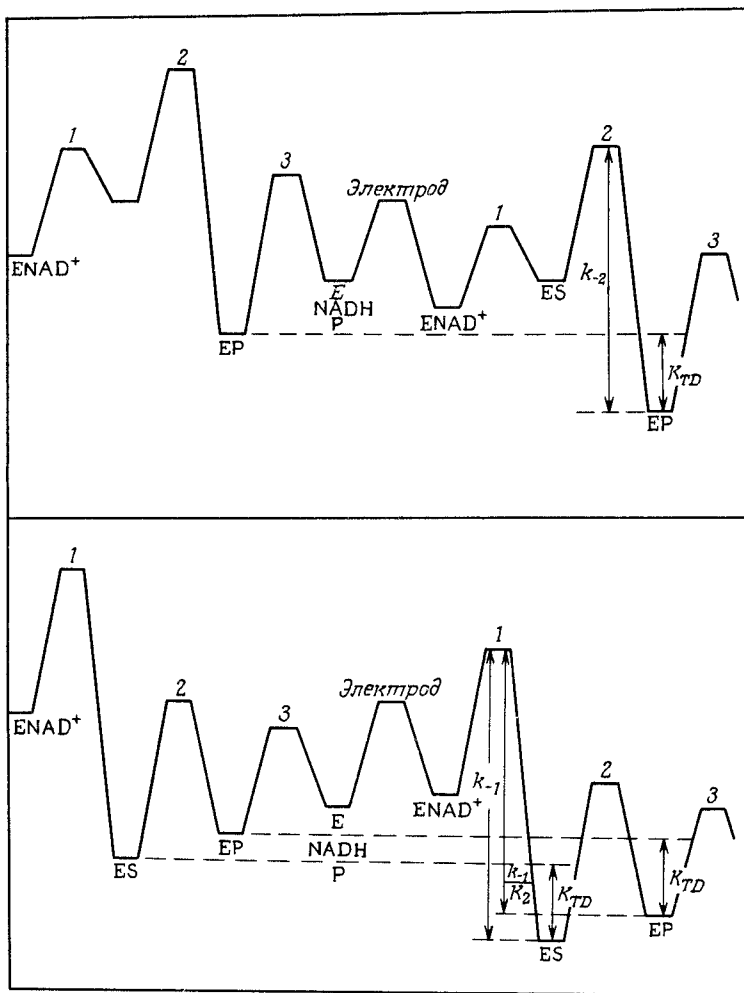


Рис. 12.3. Диаграмма свободной энергии, иллюстрирующая вклад четвертого члена уравнения (12.8). В случае, показанном сверху, определяющим является член с k_{-2} и функция электрода контролируется комбинацией константы равновесия между EP и ES и константы скорости k_2 . Внизу показан случай, когда определяющим является член с k_{-1} , функция электрода контролируется константой равновесия между ES и $E \cdot NAD^+$ и константой скорости k_1 . Если же определяющим является отношение k_1/k_2 , функция электрода зависит от комбинации константы равновесия между EP и $E \cdot NAD^+$ и константы скорости k_1 .

описании появляются константы скоростей обратных реакций, поскольку изменение свободной энергии более удобно выражать как отношение суммарной константы равновесия K_{TD} и константы скорости обратной реакции, а не с помощью более сложного выражения через константу скорости прямой реакции. Появление на диаграмме рис. 12.3 константы скорости электрохимической реакции связано с тем, что NADH выделяется перед скоростьопределяющим процессом, а концентрация NADH зависит от кинетики электродного процесса. Интересно, что, согласно уравнению (12.13), j может меняться пропорционально $[S]$, $[S]^{1/2}$ и даже $[S]^{1/3}$, в зависимости от того, какой член уравнения является доминирующим.

Хочется подчеркнуть, что при выводе выражений, описывающих кинетику реакций для ферментных электродов, важно, во-первых, представлять результат в виде функции величин, обратных константам скоростей реакций, и, во-вторых, интерпретировать полученные выражения с помощью диаграмм свободной энергии. Оба подхода мы успешно использовали в работах по кинетике гомогенных ферментативных реакций [6, 9].

12.6. Отсутствие ингибирования фермента продуктом реакции

Уравнения (12.8), (12.11) и (12.13) слишком сложны для расчета j ; с нашей точки зрения, в данном случае попытки решения уравнений третьей или четвертой степени почти ничего не дадут для понимания сути процессов. Маловероятно, однако, что в реальной системе все члены данного уравнения одинаково значимы. Проведенный выше анализ уравнений позволяет идентифицировать скоростьопределяющий процесс. В тех случаях, когда отсутствует ингибирование продуктом, уравнения (12.8), (12.11) и (12.13) сводятся к одному виду, и, таким образом, наш теоретический подход применим к широкому кругу ферментных электродов.

Для дальнейшего анализа мы выбрали уравнение (12.8). Начнем с преобразования его к виду, сходному с уравнением Хэйнеса [18] для анализа кинетики ферментативных реакций в рамках модели Михаэлиса – Ментен:

$$\frac{s_{\infty}}{j} = \frac{1}{k'_{ME}} \left[1 + \frac{s_{\infty}}{K_{ME}} \left(1 - \frac{j}{k'_s s_{\infty}} \right) \right]. \quad (12.14)$$

В это уравнение мы ввели эффективную константу скорости k'_{ME} электрохимической реакции в ферментном электроде с низкой концентрацией субстрата, определяемую выражением

$$1/k'_{ME} = K_M / (e_{\Sigma} L k_{кат}) + 1/k'_s. \quad (12.15)$$

Аналогичный параметр мы вводили ранее [4, 5] при описании модифицированных электродов, и, действительно, K_M соответствует случаю рассмотренных тогда слоистых систем. В зависимости от того, какая реакция медленнее, K_{ME} определяется либо кинетикой ферментативного процесса (член, содержащий $K_M/k_{кат}$), либо транспортом субстрата через мембрану (член с k'). Еще раз отметим, что выражение (12.15) включает величины, обратные константам скоростей этих процессов.

В уравнение (12.14) мы ввели также константу K_{ME} , эквивалентную константе Михаэлиса для ферментного электрода. K_{ME} определяется выражением

$$K_{ME} = \frac{K_M (L k_{кат})^{-1} + e_{\Sigma} (k'_s)^{-1}}{(L k_{кат})^{-1} + (k')^{-1}}. \quad (12.16)$$

По смыслу K_{ME} аналогична константе Михаэлиса для кинетики гомогенной ферментативной реакции. При концентрациях меньше K_{ME} система является ненасыщенной. В этом случае ток пропорционален концентрации субстрата и определяется константой скорости k_{ME} . При концентрации выше K_{ME} система становится насыщенной и поток j достигает максимального значения j_{max} , который можно выразить через константу $k_{кат}$:

$$(k'_{кат, E})^{-1} = (L k_{кат})^{-1} + (k')^{-1} = e_{\Sigma} / j_{max}. \quad (12.17)$$

Поскольку константа $k'_{кат, E}$ описывает поток на единицу площади, она имеет обычную размерность константы скорости электрохимического процесса ($\text{см} \cdot \text{с}^{-1}$). Из уравнения (12.7), также содержащего величины, обратные константам скоростей реакций, видно, что в зависимости от того, какой член меньше, наблюдаемое значение $k'_{кат, E}$ опреде-

ляется либо кинетикой ферментативной реакции в стадии насыщения (константой $k_{\text{кат}}$), либо электрохимической регенерацией (k').

Из уравнений (12.15)–(12.17) получаем:

$$k'_{\text{кат, E}}/K_{\text{ME}} = k'_{\text{ME}}/e\Sigma. \quad (12.18)$$

Это уравнение характеризует ферментный электрод в условиях ненасыщенности. Оно связывает кинетический параметр ($k_{\text{кат}}/K_{\text{M}}$), используемый энзимологами, с константой скорости электрохимической реакции k' .

Первая стадия анализа заключается в нахождении k'_{ME} по графику зависимости s_{∞}/j от s_{∞} . Как видно из уравнения (12.14), при $s_{\infty} \rightarrow 0$ эта зависимость имеет предельное значение $(s_{\infty}/j)_0 = (k'_{\text{ME}})^{-1}$. Далее для значений s_{∞}/j , значительно больших, чем $(s_{\infty}/j)_0$, рассчитываем значения ρ , где

$$\rho = \frac{j/s_{\infty}}{(j/s_{\infty})_0} \leq 1. \quad (12.19)$$

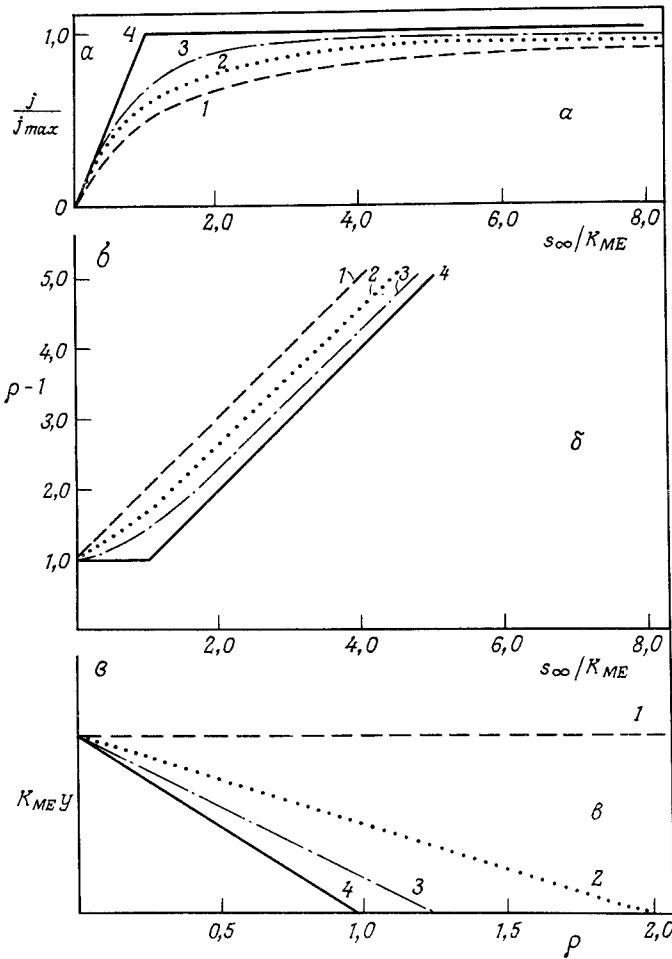


Рис. 12.4. Типичные зависимости потока от концентрации субстрата для различных значений k'_{ME}/k'_S при отсутствии ингибирования фермента продуктом реакции (а). Из этих зависимостей рассчитаны функции Хэйнеса (б) и зависимости по уравнению (12.20) (в). Значения k_{ME}/k_S : 1–0,00; 2–0,5; 3–0,80; 4–1,00.

Подстановка k'_{ME} и ρ в уравнение (12.14) дает

$$y = \frac{\rho^{-1} - 1}{s_{\infty}} = \frac{1}{K_{ME}} \left[1 - \frac{\rho k_{ME}}{k'_S} \right] \quad (12.20)$$

Уравнение (12.20) предсказывает, что зависимость y от ρ должна быть прямолинейной. По отрезку, отсекаемому на оси ординат, находим константу Михаэлиса для электрода K_{ME} , а по отрезку, отсекаемому на оси абсцисс, ρ_0 , можно оценить относительный вклад кинетики ферментативной реакции и транспорта через мембрану в наблюдаемое значение k'_{ME} . Из уравнений (12.15) и (12.20) находим, что

$$k'_S = \rho_0 k'_{ME} \quad (12.21)$$

и

$$k_{кат} e_{\Sigma} L / K_M = \rho_0 k'_{ME} / (\rho_0 - 1) \quad (12.22)$$

Если значение ρ_0 (отрезок, отсекаемый на оси абсцисс) равно единице, то скорость-определяющей стадией заведомо является транспорт S через мембрану. С другой стороны, если получается горизонтальная линия, соответствующая $\rho_0 = \infty$, то лимитирующей является не достигшая предела скорость ферментативной реакции. Следовательно, график $y(\rho)$ представляет собой важное средство диагностики. Ниже приведены примеры его применения.

На рис. 12.4 показаны типичные зависимости j от s_{∞} , графики Хэйнеса и зависимости $y(\rho)$, рассчитанные по уравнению (12.20) для различных значений k'_{ME}/k'_S . Интересно, что в случае, когда единственной скоростью-определяющей стадией является транспорт субстрата через мембрану, график зависимости потока от концентрации субстрата имеет отчетливый излом. Это связано с тем, что в этих условиях ни один из двух скоростью-определяющих процессов (транспорт субстрата или цикл превращений фермента в условиях насыщения) не зависит от внутренней концентрации субстрата s_0 . Следовательно, поток просто ограничен более медленным из этих двух процессов.

В данном разделе мы рассмотрели случаи, когда отсутствует ингибирование процесса продуктом реакции. В работе [2] описаны эффекты, связанные с ингибированием этого типа, и обсуждаются различные виды графиков, используемых для диагностики в подобных случаях.

12.7. Выбор между чувствительностью электрода и концентрационным диапазоном

После того, как определены кинетические параметры и идентифицирована скорость-определяющая стадия, оптимизировать конструкцию ферментного электрода существенно легче. Одной из важнейших конструктивных характеристик ферментного электрода является степень проницаемости мембраны для субстрата. Сделать транспорт субстрата через мембрану скоростью-определяющей стадией выгодно по двум причинам. Во-первых, при этом функция электрода определяется параметрами переноса субстрата в мембране, не зависит ни от кинетики ферментативных реакций, ни от электрохимических процессов (что хорошо, поскольку данные о кинетике не всегда надежны). Во-вторых, расширяется диапазон концентраций, в котором выполняется электродная функция. Если лимитирующей является скорость ферментативного процесса, то фермент насыщается при концентрации субстрата, лишь немного большей K_M . Однако, если процесс лимитируется скоростью транспорта, то линейную зависимость тока от концентрации можно получить и при концентрациях субстрата, значительно превышающих K_M .

Влияние проницаемости мембраны на аналитическую функцию ферментного элект-

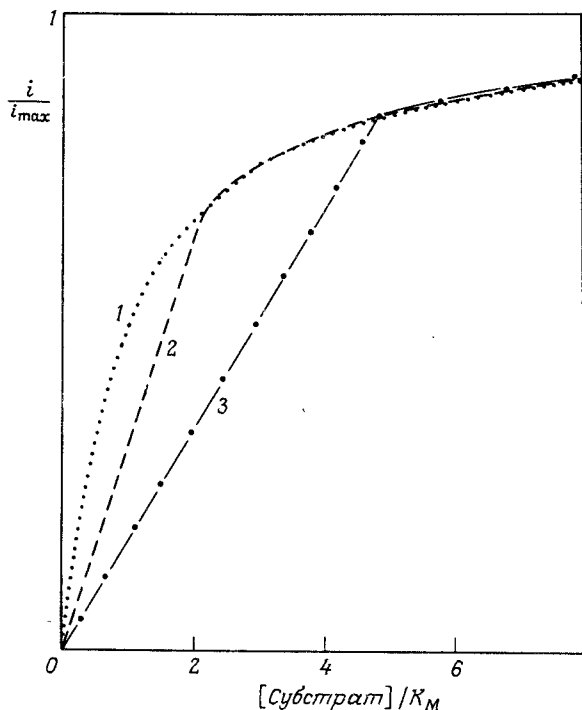


Рис. 12.5. Теоретические зависимости, показывающие влияние проницаемости мембраны на ток ферментного электрода с увеличением концентрации субстрата. 1 — скоростьопределяющей является ферментативная реакция; 2, 3 — проницаемость мембраны последовательно уменьшается.

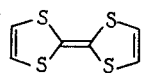
рода иллюстрируется рис. 12.5. На этом рисунке различные кривые соответствуют мембранам с разной проницаемостью. Кривая 1 описывает случай высокопроницаемой мембраны, когда скоростьюопределяющим является ферментативный процесс. Кривые 2 и 3 отвечают случаям, в которых транспорт субстрата через мембрану все более замедляется, и при низких концентрациях эта стадия определяет скорость всего процесса. Положения изломов на этих кривых указывают на последовательно возрастающие значения константы Михаэлиса K_{MF} для ферментного электрода. Естественно, что чем толще мембрана, тем меньше ток при низких концентрациях. Поэтому если важна прежде всего высокая чувствительность, то лучше использовать как можно более проницаемую мембрану. Но, если измеряемый ток избыточно велик, то имеет смысл использовать мембрану, транспорт через которую становится лимитирующей стадией. До сих пор в своей работе мы использовали мембрану, вырезанную из диализной трубки. В дальнейшем все большее значение будет иметь оптимизация электродов путем подбора соответствующих мембран.

12.8. Электроды на основе проводящих органических солей

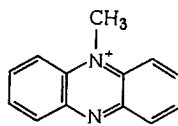
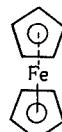
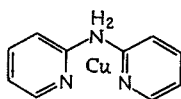
Мы исследовали ряд различных проводящих органических солей на предмет использования их в ферментных электродах [7]. Входящие в состав этих солей доноры и акцепторы электронов приведены ниже. Многие проводящие органические соли впервые были синтезированы Мелби и сотр. [24, 25], а их электрохимические свойства изучены в работах [19, 20]. Почти все полученные нами соли проявляют электрохимическую активность по отношению к глюкозооксидазе. Это открытие несколько удивило нас, поскольку мы полагали, что для эффективного переноса электрона взаимодействие между поверхностью и ферментом должно быть достаточно специфическим. На

самом деле оказалось, что эти материалы являются хорошими электрокатализаторами для различных флавопротеинов. Причина такой универсальности обсуждается ниже.

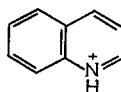
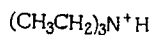
Доноры



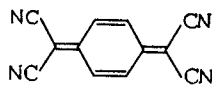
TTF

NMP⁺Fe⁺

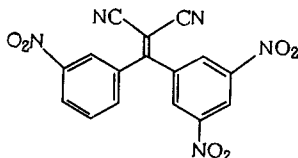
Cu(DPA)

Q⁺TEA⁺

Акцепторы



TCNQ



DTF

Предварительное исследование показало, что для обеспечения оптимальных фоновых токов и диапазона напряжений наилучшими материалами являются соли TCNQ с TTF⁺, NMP⁺ и Q⁺. Поэтому мембранные электроды изготовляли на основе именно этих трех солей. На рис. 12.6 приведены типичные токи таких электродов, измеренные при постепенном увеличении концентрации глюкозы во внешнем растворе. Данные, представленные на рис. 12.6, анализировали описанным выше методом.

Первая стадия анализа — построение графика Хэйнеса (уравнение (12.14)), т.е. зависимости $nFA \cdot [\text{Глюкоза}]/i$ от концентрации глюкозы (рис. 12.7). Чтобы скомпенсировать разную площадь электродов, используют величины плотности тока (i/A). Отрезок, отсекаемый этими зависимостями на оси ординат (нулевая концентрация глюкозы), соответствует величине, обратной электрохимической константе скорости k'_{ME} , определяемой уравнением (12.15). Полученные значения k'_{ME} приведены в табл. 12.1.

Затем рассчитывают параметр ρ из уравнения (12.19):

$$\rho = i/nFAk'_{ME}[\text{Глюкоза}]$$

и строят зависимости y от ρ (уравнение (12.20)). Соответствующие зависимости для трех изученных электродов показаны на рис. 12.8. Во всех случаях получены прямые линии, подтверждающие успех проведенного анализа. Эти зависимости пересекаются с осью абсцисс при значении $\rho(\rho_0)$, равном единице, а это, как отмечалось выше при обсуждении уравнений (12.21) и (12.22), свидетельствует о том, что при низких концентрациях субстрата скоростьопределяющей стадией является диффузия глюкозы через мембрану. Последующие ферментативная и электрохимическая стадии столь

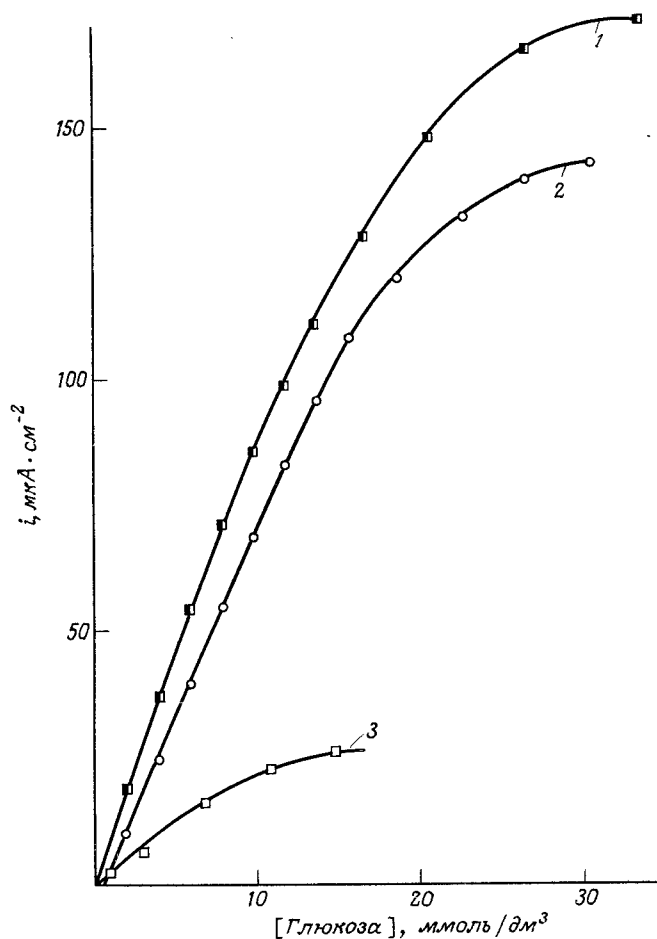


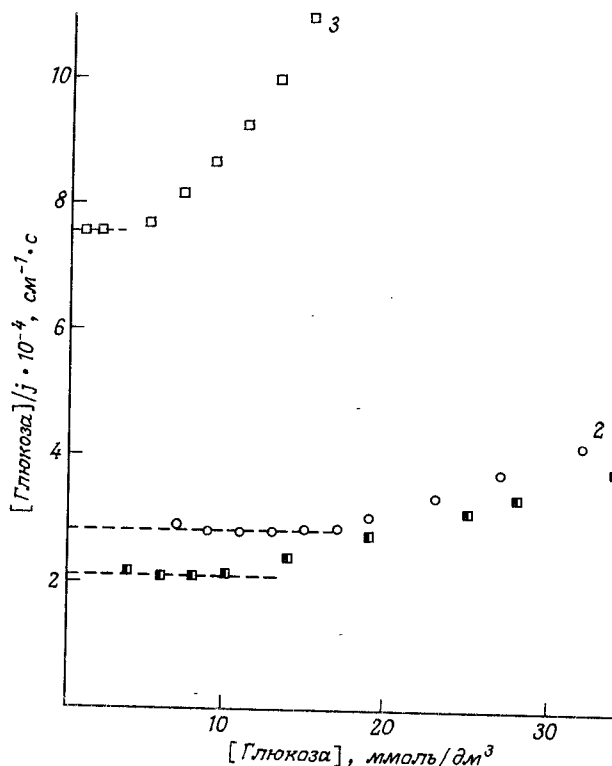
Рис. 12.6. Типичные зависимости токов мембранных электродов от концентрации глюкозы. Материал электрода: 1 — TTF^+TCNQ^- ; 2 — NMP^+TCNQ^- ; 3 — $Q^+(TCNQ)_2^-$.

быстры, что никак не ограничивают скорость всего процесса. Выполнение этого условия благоприятствует получению надежного сенсора, поскольку кинетика ферментативной и электрохимической реакции не сказывается на его функции. До тех пор, пока это условие соблюдается, спад активности фермента или электрода не оказывает влияния на аналитическую функцию сенсора.

Представленные на рис. 12.6 результаты показывают, что концентрацию глюкозы можно определять в диапазоне от 50 мкмоль/дм³ до 10 ммоль/дм³. Тот факт, что скоростьюопределяющей стадией является транспорт глюкозы через мембрану, объясняет, почему все значения k'_{ME} в табл. 12.1 так близки и не зависят от материала электрода. Толщина мембраны L_M для всех электродов составляла 0,3 мм. Подстановка этого значения L_M в уравнение $k'_s = D_s K_s / L_M$ (см. выше) дает значение величины $K_s D_s$ порядка $10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Это значение хорошо согласуется с данными [16], полученными при исследовании транспорта через подобную мембрану с помощью вращающегося дискового электрода.

Вернемся к рис. 12.8. Величины отрезков, отсекаемых приведенными на нем зависимостями на осях, позволяют по уравнению (12.20) рассчитать значения k_{ME} .

Рис. 12.7. Графики Хэйнеса, построенные по данным рис. 12.6. Материал электрода: ■ — TTF⁺TCNQ⁻; ○ — NMP⁺TCNQ⁻; □ — Q⁺(TCNQ)₂⁻.



Далее можно установить скоростьопределяющий процесс для насыщенного ферментного электрода и найти соответствующую константу $k'_{кат, E}$ по уравнению (12.17). Значения k_{ME} и $k'_{кат, E}$ даны в табл. 12.1.

Два члена уравнения (12.17) характеризуют предельную (в условиях насыщения) кинетику ферментативной и электрохимической реакций. Их отношение можно найти, зная K_{ME} , K_M и отношение k'_S/k'_{ME} , которое определяют по графикам, построенным с помощью уравнения (12.20). Из уравнений (12.15) и (12.16) получаем

$$\frac{k'_{кат} L}{k'} = \frac{K_M}{K_{ME} (1 - k'_{ME}/k'_S)} - 1. \quad (12.23)$$

В литературе приведено значение $K_M = 7$ ммоль/дм³ [11]. Значения K_{ME} (табл. 12.1)

Таблица 12.1. Характеристики мембранных электродов на основе органических солей

Электродный материал	$k'_{ME} \cdot 10^5$, см ² · с ⁻¹ ^a	K_{ME} , ммоль/дм ³ ^b	$k'_{кат} \cdot 10^2$, см ² · с ⁻¹ ^c
TTF ⁺ TCNQ ⁻	4,7	20	9
NMP ⁺ TCNQ ⁻	3,0	22	8
Q ⁺ TCNQ ⁻	1,3	11	1,4

^a Рассчитано по уравнению (12.14); ^b — по уравнению (12.20); ^c — по уравнению (12.18).

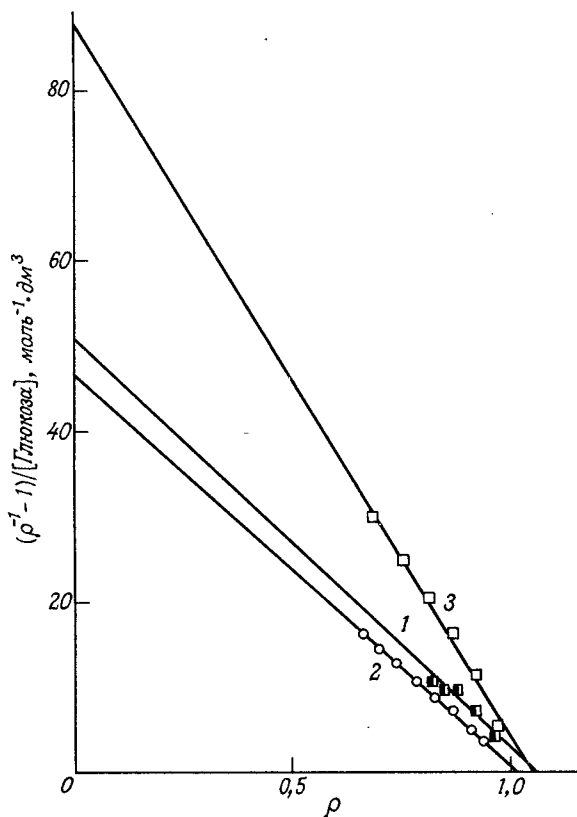


Рис. 12.8. Зависимости, рассчитанные из данных рис. 12.7 по уравнению (12.20). Материал электрода: 1- $\text{TTF}^+ \text{TCNQ}^-$; 2- $\text{NMP}^+ \text{TCNQ}^-$; 3- $\text{Q}^+ (\text{TCNQ})_2^-$.

составляют около 5 ммоль/дм^3 . В пределах ошибки эксперимента для всех трех материалов $k'_{\text{МЕ}}$ равно k'_s . Отсюда можно заключить, что член в скобках в знаменателе уравнения (12.15) меньше 0,1. Тогда

$$k_{\text{кат}} L / k' > 10, \quad (12.24)$$

и это означает, что в области насыщения лимитирующей стадией является электрохимическая, а не ферментативная реакция. Для всех трех материалов константы скорости электрохимической реакции k' представлены приведенными в табл. 12.1 величинами $k'_{\text{кат}}$, е. При $k_{\text{кат}} = 800 \text{ с}^{-1}$ [26] и L , равном нескольким десяткам микрон, находим, что, в соответствии с результатами нашего анализа, члены уравнения (12.16) действительно неэквивалентны. Удачно, что все три материала (табл. 12.1) являются хорошими электрокатализаторами прямого электрохимического окисления глюкозооксидазы с константами скорости k' , превышающими $10^{-2} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$.

12.9. Механизм электрохимической реакции

Необходимо иметь в виду, что существует разногласие относительно того, осуществляется ли окисление фермента прямым переносом электрона на поверхность электрода или же имеет место перенос электрона с помощью медиатора. В последнем случае фермент реагирует в растворе электролита с TTF^+ или TCNQ^- , а затем эти частицы вновь окисляются на электроде. Ценас и Кулис [14] утверждают, что реакция

глюкозооксидазы на электроде из NMP^+TCNQ^- протекает с участием медиатора. Однако, как показано в работе [7], аргументы этих авторов неубедительны. С помощью дискового электрода с кольцом мы пытались определить содержание растворенного NMP^+ или $TCNQ^-$ вблизи электрода. К нашему удивлению, сделать это оказалось невозможно. Отсюда мы сделали вывод, что концентрации этих ионов должны быть значительно меньше 1 мкмоль/дм^3 . Сопоставляя эти концентрации с константами скоростей гомогенных реакций второго порядка, полученными Ценасом и Кулисом ($\sim 10^4 \text{ дм}^3 \text{ моль}^{-1} \text{ с}^{-1}$), находим, что гомогенный механизм с участием медиатора никоим образом не может дать таких высоких значений $k'_{\text{кат, E}}$, что приведены в табл. 12.1. Растворимость солей слишком мала, а скорость гомогенной реакции — низка, чтобы медиаторный механизм переноса был эффективным.

Интересно было бы обсудить, почему проводящие органические соли являются такими хорошими электрокатализаторами для флавопротеинов. Мы обнаружили, что многие из этих ферментов так сильно адсорбируются на поверхности электрода, что можно изготовить сенсор вообще без мембраны. Достаточно окунуть электрод в раствор фермента, удалить избыток фермента промыванием, и электрод готов. Адсорбированный слой держится настолько прочно, что не переходит с поверхности даже в раствор, в котором отсутствует фермент. Причиной такого сильного притяжения может быть то, что в структуре проводящей соли чередуются положительные и отрицательные ионы. Можно ожидать, что беспорядочно разбросанные по поверхности положительные и отрицательные заряды сильно взаимодействуют с соответствующими зарядами на поверхности фермента. Некоторые исследователи предпочитают объяснять это явление гидрофобным взаимодействием между ферментом и ароматическими группами на поверхности электрода. Нами показана [8] важность

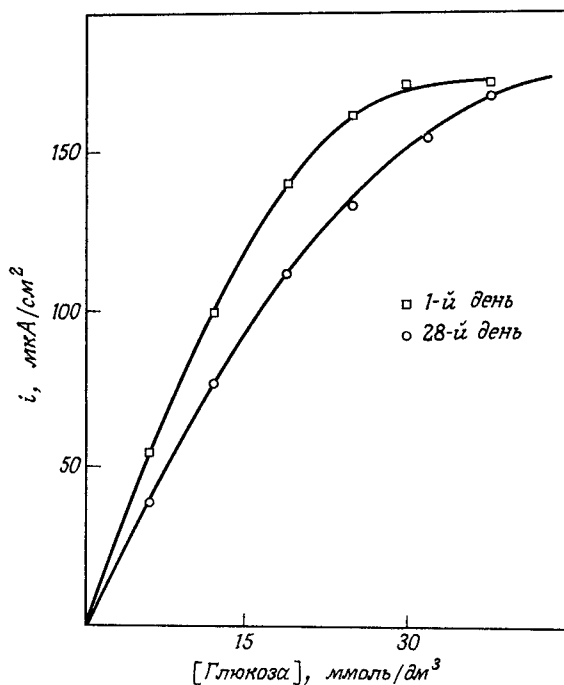


Рис. 12.9. Сигнал глюкозного ферментного электрода сразу по изготовлении и после 28 дней непрерывного использования.

притяжательного взаимодействия между ферментом и электродом для каталитического переноса электрона в биохимических реакциях. Именно такое взаимодействие наблюдается между флавопротеиновыми ферментами и проводящими солями.

12.10. Стабильность электрода

Стабильность этих электродов также очень высока. Мембранный электрод может работать непрерывно в течение 28 дней. Результаты длительных испытаний электрода для определения глюкозы представлены на рис. 12.9. После месяца работы сенсор потерял всего 20% первоначальной активности. Кинетический анализ, подобный приведенному выше, показал, что лимитирующей стадией по-прежнему остается транспорт субстрата через мембрану, а небольшая потеря активности электрода, по-видимому, связана с порчей мембраны. Еще раз подчеркнем, как важно знать, что в этом случае функция электрода определяется свойствами мембраны.

12.11. Другие ферменты

До сих пор наше внимание было сосредоточено на системе с глюкозооксидазой, но и другие ферменты реагируют с электродами на основе проводящих органических солей. Из исследованных нами материалов [7] соль $\text{TTF}^+ \text{TCNQ}^-$ дает наименьший фоновый ток, поэтому для дальнейшей работы была выбрана именно она. Этот электродный материал использовали в сочетании с четырьмя ферментными системами, содержащими флавиновую простетическую группу, FAD. Во всех случаях восстановленный фермент можно окислять непосредственно на электроде. Подробные сведения об исследованных фермент-субстратных системах приведены в табл. 12.2. В каждой

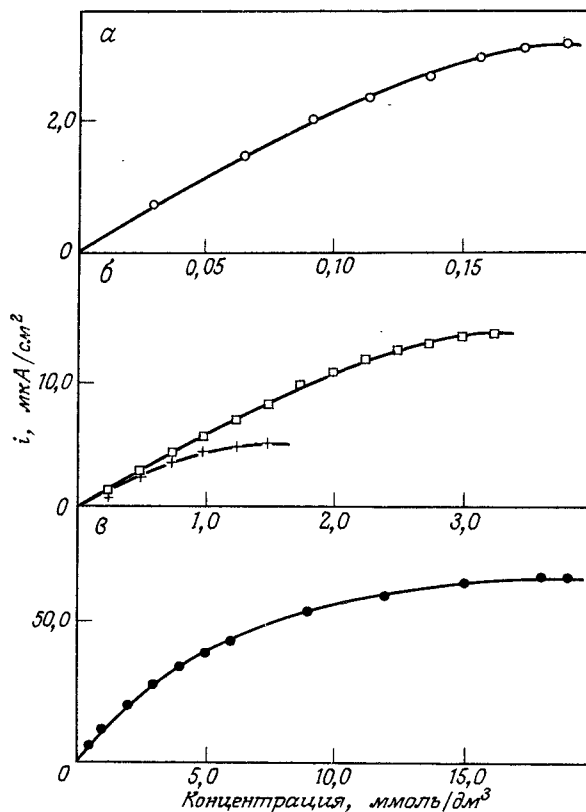
Таблица 12.2. Характеристики фермент-субстратных систем

Фермент	Активность, μ/мг	Субстрат	pH	Буферный раствор (0,1 M)
Ксантинооксидаза (EC 1.2.3.2)	1,25	Ксантин	7,4	Фосфатный
D-Аминокислотная оксидаза (EC 1.4.3.3)	14	D-Аланин	8,0	Трис
L-Аминокислотная оксидаза (EC 1.4.3.2)	0,44	Фенилаланин	6,5	Фосфатный
Холинооксидаза (EC 1.1.3.17)	50	Бетаиновый альдегид	7,4	Фосфатный

такой системе мембранный электрод чувствителен к увеличению концентрации соответствующего субстрата. На рис. 12.10 представлены типичные результаты для всех четырех систем. Эти результаты анализировали в соответствии с описанным выше подходом. На рис. 12.11, *a-b* показаны рассчитанные по уравнению (12.20) зависимости $y(\rho)$ для ксантинооксидазы и D- и L-аминокислотной оксидазы. Во всех трех случаях получены прямые, пересекающие ось абсцисс в точке со значением $\rho = +1$. Это показывает, что скоростьюопределяющей стадией является транспорт субстрата через мембрану. Следовательно, как и в случае глюкозооксидазы, в рассматриваемых комбинациях трех ферментов с электродом на основе $\text{TTF}^+ \text{TCNQ}^-$ скорость реакции достаточно велика для того, чтобы расходовался весь субстрат, диффундирующий через мембрану.

Как видно из табл. 12.3, для всех трех ферментов значения k'_s сходны и близки к наблюдаемым для глюкозооксидазы. Это и не удивительно. Для диализной мембраны

Рис. 12.10. Типичные сигналы ферментных электродов при увеличении концентрации соответствующего субстрата: а - ксантиноксидазы; б - D-аминокислотной (+) и L-аминокислотной (□) оксидазы; в - холиноксидазы. Материал электрода во всех случаях - $\text{TTF}^+ \text{TCNQ}^-$.



можно было ожидать значения k_s , близкого к единице, и, следовательно, отличающиеся значения k'_s для разных субстратов отражают различия в их коэффициентах диффузии. Маловероятно, что эти различия велики для близких по размеру субстратов.

По величинам отрезков, отсекаемых на оси y зависимостями $y(\rho)$ (рис. 12.11), с помощью уравнения (12.20) можно найти K_{ME} . Как и в случае глюкозооксидазы, полученные значения K_{ME} , очевидно, определяются соотношением между кинетикой транспорта субстрата и окисления фермента на электроде:

$$K_{ME} = k' e_{\Sigma} / k_{ME}, \quad (12.25)$$

где k' - константа скорости электрохимического окисления фермента. Из табл. 12.3 видно, что все значения k' больше $10^{-4} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$. Такие высокие значения констант скоростей электрохимических процессов еще раз подтверждают преимущества использования органических проводников в качестве электродных материалов для ферментов.

Таблица 12.3. Характеристики ферментных электродов

Фермент	$k'_s, \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$	$k_{ME}, \text{ ммоль/дм}^3$	$k, \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$
Ксантиноксидаза	$1,1 \cdot 10^{-4}$	0,2	$3,7 \cdot 10^{-4}$
D-Аминокислотная оксидаза	$2,6 \cdot 10^{-5}$	1,1	$2,4 \cdot 10^{-4}$
L-Аминокислотная оксидаза	$2,8 \cdot 10^{-5}$	2,6	$4,6 \cdot 10^{-2}$
Холиноксидаза	$2,8 \cdot 10^{-4}$	1,8	$3,0 \cdot 10^{-3}$

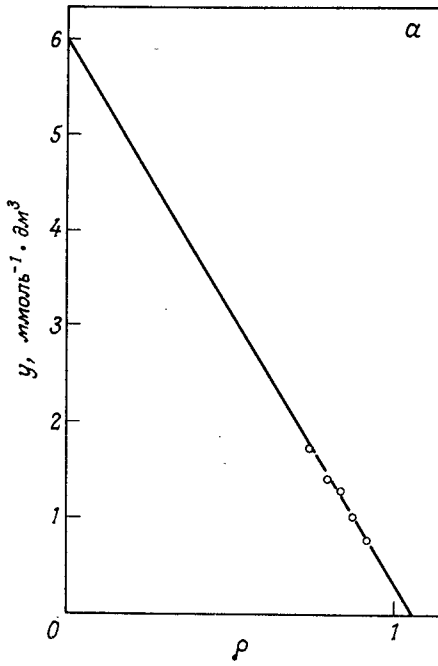
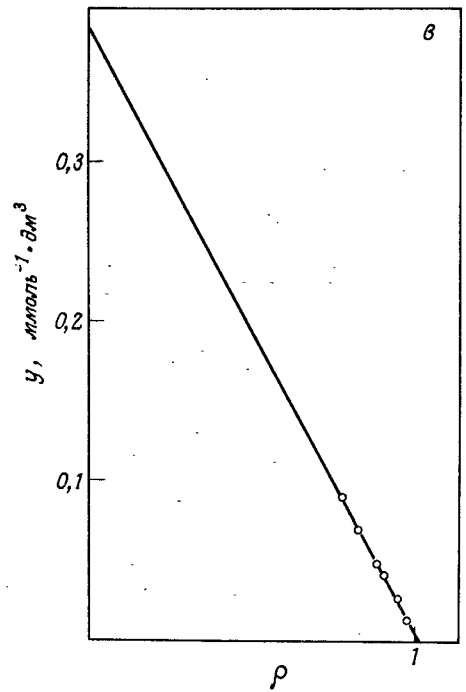
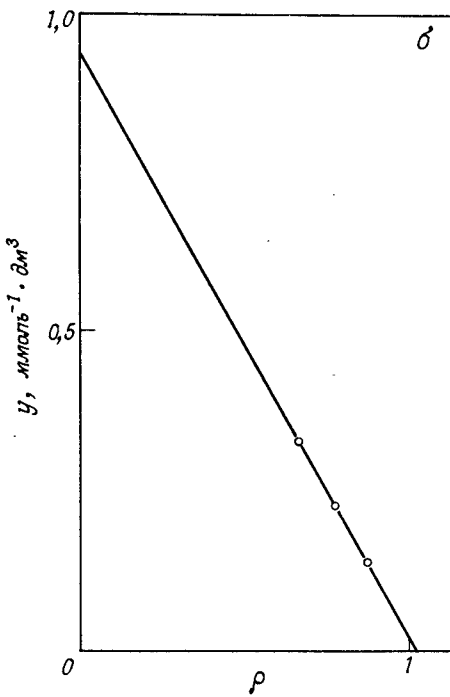


Рис. 12.11. Зависимости $y(\rho)$, рассчитанные по данным рис. 12.10 с помощью уравнения (12.20) для электродов на основе ксантиноксидазы (а), D-аминокислотной (б) и L-аминокислотной оксидазы (в).



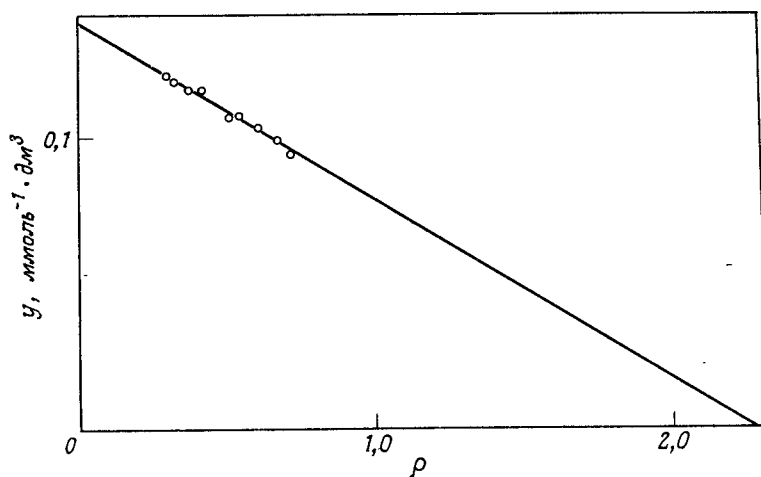


Рис. 12.12. Зависимость $y(\rho)$ для холиноксидазного электрода, рассчитанная по данным рис. 12.10 с помощью уравнения (12.20).

Обратимся к холиноксидазе. Это несколько более сложная система, поскольку продукт ферментативного окисления холина, бетаиновый альдегид, сам может служить субстратом для данного фермента. Для упрощения анализа мы использовали бетаиновый альдегид в качестве субстрата ферментного электрода. На рис. 12.12 приведена зависимость $y(\rho)$ для данной системы. Эта зависимость также линейна, но пересекает ось абсцисс при $\rho_0 \approx +2$, а не при $\rho_0 = +1$, как в предыдущих случаях. Согласно уравнениям (12.20) и (12.21), значение ρ_0 , равное $+2$, означает, что кинетика ферментативной реакции и транспорт субстрата вносят равный вклад в наблюдаемую константу скорости k'_{ME} . И в этом случае рассчитанное по уравнению (12.21) значение k'_S (табл. 12.4) близко к значениям этой же константы для других субстратов. В табл. 12.4

Таблица 12.4. Скоростьюопределяющие стадии, соответствующие различным значениям K_{ME} и ρ_0^*

	$K_{ME} < K_M$	$K_{ME} = K_M$	$K_{ME} > K_M$
$\rho_0 = 1$	Транспорт Электрохимическая реакция	Транспорт Электрохимическая реакция	Транспорт ?
$\rho_0 = \infty$	Ферментативная реакция Электрохимическая реакция	Ферментативная реакция Ферментативная реакция	Ферментативная реакция Неопределенная ситуация

* Для каждой комбинации ρ_0 и K_{ME} сверху указана скоростьопределяющая стадия при низких, а внизу — при высоких концентрациях субстрата.

приведена также константа скорости электрохимической реакции k' , найденная описанным выше способом. Важно, что полученное значение k' достаточно велико — $10^{-3} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$.

12.12. NADH-электроды

Обсудим теперь различные варианты применения электродов из органического проводящего материала с ферментами, которые имеют один и тот же кофактор — NAD^+/NADH . По нашим данным [2], константа скорости электрохимического окисления NADH на электроде из проводящей органической соли $\text{NMP}^+ \text{TCNQ}^-$ достигает $10^{-2} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$. На основе этого материала мы разработали ферментный электрод, в котором для окисления ряда различных спиртов, таких как этанол, бутанол-1 и пропанол-2, используется дрожжевая этанолдегидрогеназа (ЕС 1.1.1.1). Схема реакций для такого электрода рассмотрена в разделе 12.5.

На рис. 12.13 показано, как увеличивается ток ферментного NADH-электрода с ростом концентрации этанола. По этим данным описанным выше способом рассчитана зависимость $y(\rho)$ (рис. 12.14). Она имеет вид прямой, параллельной оси абсцисс, что соответствует $\rho_0 = \infty$ и, согласно уравнениям (12.21) и (12.22), свидетельствует о том, что скоростьопределяющей стадией является ферментативная реакция. Тот факт, что график представляет собой прямую, приводит к заключению, что члены, содержащие j и j^2 , в правой части уравнения (12.13) незначимы, поэтому уравнение можно упростить. Действительно, при добавлении продукта реакции — ацетальдегида — во внешний раствор ток не уменьшается. Следовательно, в данном случае насыщение электрода связано с кинетикой не электрохимической, а ферментативной реакции. В пользу этого вывода говорит то, что найденное из данных рис. 12.14 (по отрезку, отсекаемому на оси ординат) значение $K_{\text{ME}} = 7,7 \text{ ммоль/дм}^{-3}$ находится в хорошем согласии с приведенными в литературе значениями K_{M} , составляющими 13 [10] и 13,1 ммоль/дм³ [23]. Если кинетика ферментативной реакции определяет поведение электрода как в ненасыщенном, так и в насыщенном состоянии, то $K_{\text{ME}} = K_{\text{M}}$. Следовательно, поведение этого ферментного электрода, для которого скоростьопределяющей стадией всегда является ферментативная реакция, существенно отличается от поведения глюкозооксидазного электрода, для которого, напротив, ферментативная реакция никогда не бывает лимитирующей стадией.

Преимущество хорошего электрода для окисления NADH заключается в том, что при эффективном расходовании NADH на электроде его концентрация уменьшается настолько, что можно исключить обратную реакцию, ингибирование продуктом ферментативной реакции, и пренебречь вкладом членов, содержащих j и j^2 , в уравнение

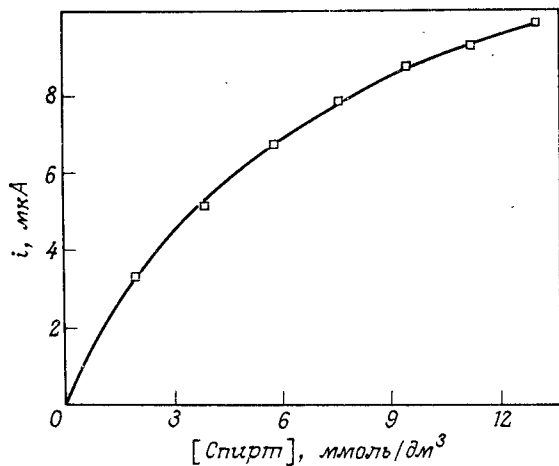
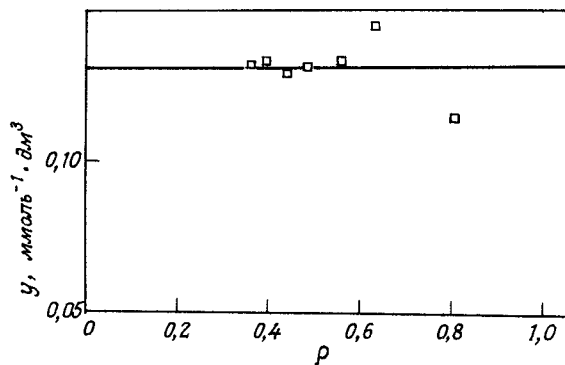


Рис. 12.13. Изменение сигнала спиртового ферментного электрода с увеличением концентрации этанола.

Рис. 12.14. График, построенный по данным рис. 12.13 с помощью уравнения (12.20).



(12.13). По нашим оценкам при используемых плотностях тока концентрация NADH в окружающей среде составляет всего 10 мкмоль/дм³. Присутствие электрода, на котором окисляется NADH, способствует более полному протеканию реакции. Высокое значение k' может компенсировать в уравнении (12.13) малое значение K_{TD} в знаменателях членов, характеризующих ингибирование продуктом ферментативной реакции.

12.13. Выводы

Для обеспечения поведения ферментных электродов различных типов мы успешно использовали зависимость $y(\rho)$, описываемую уравнением (12.20). При помощи этой

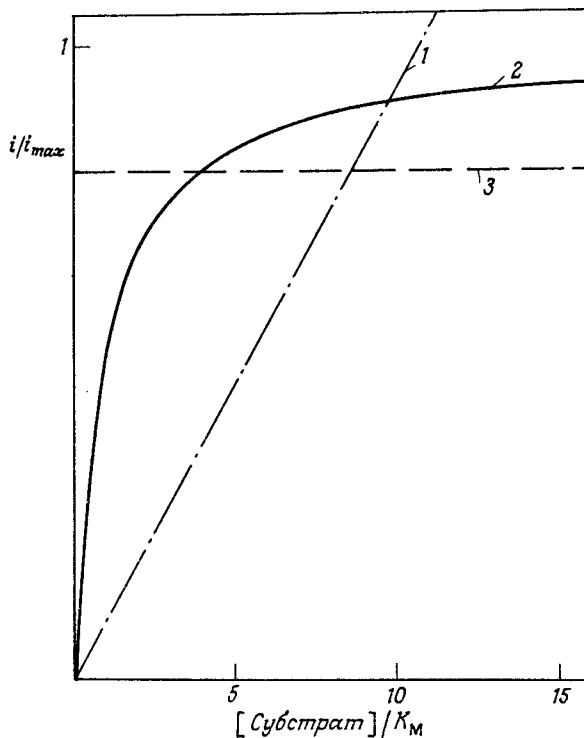


Рис. 12.15. Теоретические зависимости тока ферментного электрода от концентрации субстрата для случая, когда функция электрода контролируется скоростью диффузии субстрата через мембрану (1), кинетикой ферментативной реакции (2) и кинетикой электрохимической реакции (3).

зависимости можно найти K_{ME} и ρ_0 . Знания этих двух параметров, а также величины K_M для фермента во многих случаях достаточно для идентификации скоростьопределяющей стадии для данного электрода. На рис. 12.15 показано влияние концентрации субстрата на скорость его транспорта через мембрану, ферментативной и электродной реакций. Анализ этих кривых позволяет охарактеризовать различные случаи, сведенные в табл. 12.4. При разработке ферментных электродов такой анализ имеет принципиальное значение. Так, не имеет смысла уделять много внимания выбору фермента или электрода, если проблема заключается в мембране.

Благодарность

Выражаем глубокую благодарность нашим коллегам, докторам Н. П. Барлетт и А. Е. Г. Гасс, М. Бикфорт, Б. Дж. Дрисколл и К. У. Сим, на чьи работы мы ссылались в данной главе. Благодарим SERC, ВР, Лондонский университет и Genetics International за финансовую поддержку. Работа выполнена в Imperial College Sensors Group.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Albery W.J.* Electrode kinetics, p. 58. Oxford University Press, Oxford, 1975.
2. *Albery W.J., Bartlett P.N.* An organic conductor electrode for the oxidation of NADH. *J. Chem. Soc., Chem., Commun.*, 234–6 (1984).
3. *Albery W.J.* Amperometric enzyme electrodes, Part I. Theory. *J. Electroanal. Chem.*, **194**, 211–22 (1985).
4. *Albery W.J., Hillman A.R.* Electrode kinetics. *Ann. Rep. Prog. Chem., Sect. C.* 377–437 (1981).
5. *Albery W.J.* Transport and kinetics in modified electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **170**, 27–49 (1984).
6. *Albery W.J., Knowles J.R.* Evolution of enzyme function and the development of catalytic efficiency. *Biochemistry*, **15**, 5631–40 (1976).
7. *Albery W.J., Knowles J.R.* Energetics of enzyme catalysis. Isotropic experiments, enzyme conversion and oversaturation. *J. Theoret. Biol.*, **124**, 137–71 (1987).
8. *Albery W.J., Bartlett P.N., Craston D.H.* Amperometric enzyme electrodes, Part II. Conducting organic salts as electrode materials for oxidation of the glucose oxidase. *J. Electroanal. Chem.*, **194**, 223–35 (1985).
9. *Albery W.J., Eddowes M.J., Hill H.A.O., Hillman A.R.* Mechanism of the reduction and oxidation reaction of cytochrome *c* at a modified gold electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3904–10 (1981).
10. *Barman T.E.* Enzyme handbook, vol. 1, p. 23. Springer Verlag, New York, 1969.
11. *Cardosi M. Ph. D.* Thesis, Department of Biochemistry, Imperial College, 1984.
12. *Cass A.E.G., Davis G., Francis G.D., Hill H.A.O., Aston W.J., Higgins I.J., Plotkin E.V., Scott L.D.L., Turner A.P.F.* Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.*, **56**, 667–71 (1984).
13. *Cass A.E.G., Hill H.A.O., Higgins I.J., Plotkin E.V., Turner A.P.F., Aston W.J.* Amperometric enzyme electrode for glucose determination. In *Charge and field effects in biosystems* (ed. M.J. Allen, P.N.R. Underwood), p. 475–82. Abacus Press, Tunbridge, 1984.
14. *Cenas N.K., Kulys J.J.* Biocatalytic oxidation of glucose on the conductive charge transfer complexes. *J. Electroanal. Chem.*, **128**, 103–13 (1981).
15. *Clark L.C., Lyons C.* Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962).
16. *Gough D.A., Leypold J.K.* Transient studies of glucose, oxygen, and hydroquinone at a membrane covered rotating disc electrode. *J. Electrochem. Soc.*, **127**, 1278–87 (1980).
17. *Guilbault G.G., Lubrano G.J.* An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Anal. Chim. Acta*, **64**, 436 (1973).
18. *Hanes C.S. CLXVII.* Studies on plant amylases. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem. J.*, **26**, 1406 (1932).
19. *Jaeger C.D., Bard A.J.* Electrochemical behaviour of tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane electrodes in aqueous media. *J. Am. Chem. Soc.*, **101**, 1690–9 (1979).
20. *Jaeger C.D.* Electrochemical behavior of donor-tetracyanoquinodimethane electrodes in aqueous media. *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 5435–42 (1980).
21. *Kulys J.J.* Development of new analytical systems based on biocatalysers. *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 342–352 (1981).
22. *Kulys J.J., Samalius A.S., Svirnickas G.J.S.* Electron exchange between the enzyme active centre and organic metal. *FEBS Lett.*, **114**, 7–10 (1980).

23. *Mazid M. A., Laidler K. J.* pH dependence of free and immobilized yeast alcohol dehydrogenase kinetics. *Can. J. Biochem.*, **60**, 100–7 (1982).
24. *Melby L. R.* Substituted quinodimethans. VIII. Salts derived from the 7, 7, 8, 8-tetracyanoquinodimethan anion-radical and benzologues of quaternary pyrazinium cations. *Can. J. Chem.*, **43**, 1448–53 (1965).
25. *Melby L. R., Harber R. J., Hertler W. R., Mahler W., Benson R. E., Mochel W. E.* Substituted quinodimethans. II. Anion-radical derivatives and complexes of 7, 7, 8, 8-tetracyanoquinodimethan. *J. Am. Chem. Soc.*, **84**, 3374 (1962).
26. *Wiebel M. K., Bright H. J.* The glucose oxidase mechanism, interpretation of pH dependence. *J. Biol. Chem.*, **246**, 2734–44 (1971).

Исследование модифицированных электродов электрохимическими методами

Н. П. Барлетт

13.1. Введение

За последние двенадцать лет модифицированные электроды были настолько хорошо изучены, что сейчас появилась возможность конструировать поверхность раздела электрод/раствор, применяя хорошо отработанные методы синтеза. Существенным моментом в проектировании биосенсоров является создание методов контроля молекулярной структуры поверхности электрода, с помощью которых можно приспособить электрод к конкретной биологической системе. Этот подход особенно интересен при разработке амперометрических биосенсоров, поскольку обычные металлические электроды, как правило, мало пригодны для вольтамперометрических измерений в системах, где происходит прямое окисление или восстановление ферментов или коферментов. Для дальнейшего развития этого подхода необходимы некоторые данные о свойствах модифицированного электрода и его взаимодействии с субстратом. В этой главе рассматриваются различные методы исследования модифицированных электродов. Однако вначале мы остановимся на способах модификации электродов и теоретических моделях, используемых для описания их свойств.

Начиная с ранних работ [55, 56] по адсорбции ненасыщенных мономеров на электродах, разработано и изучено множество различных методов модификации электродов. Классификация этих методов приведена на рис. 13.1; подробно они обсуждаются в недавних работах [3, 34, 66], а здесь мы ограничимся лишь кратким обзором. Как уже отмечалось, Лейн и Хаббард [55, 56] использовали адсорбцию частиц на поверхности электрода. Такая модификация часто обратима, и, следовательно, чтобы поддерживать покрытие поверхности электрода в требуемом состоянии, необходима достаточно высокая концентрация свободных частиц модификатора в растворе. Кроме того, обычно этот метод дает лишь монослойное или субмонослойное покрытие. Позже были разработаны методы прямого ковалентного присоединения редокс-медиаторов к поверхности электрода [64, 65]. Эти методы основаны на непосредственном химическом связывании редокс-группы с поверхностью электрода и включают силанизирование поверхности с образованием связей $M-O-Si$; использование цианурхлорида или, в случае углеродных материалов, прямую реакцию с кислотными или карбонильными функциональными группами на поверхности электрода. Чаще всего эти методы применяют для получения монослойных покрытий, хотя при разумном контроле условий обработки их можно адаптировать и для получения электродов с многослойным покрытием [23].

Для получения многослойного покрытия электродных поверхностей обычно используют полимеры. Это направление быстро развивается. Разработаны методы электрохимической полимеризации соответствующих мономеров с образованием плотно сцепленных с поверхностью редокс-полимерных пленок; нанесения полимерной

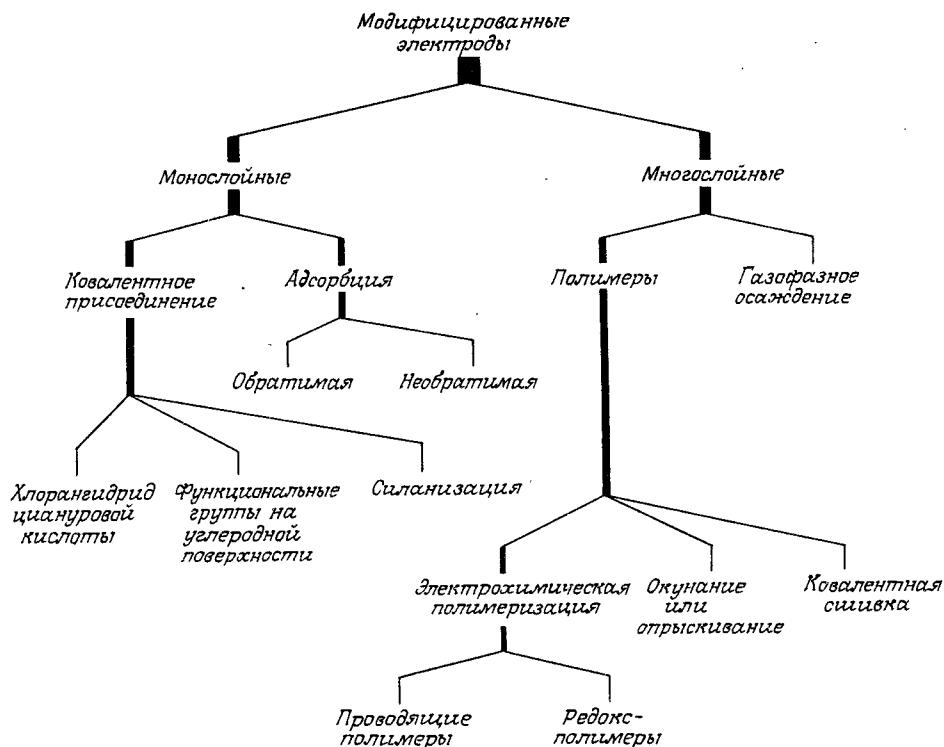
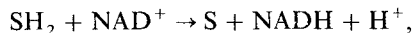


Рис. 13.1. Различные типы модифицированных электродов.

пленки путем поливания или опускания электрода в раствор мономера; газофазной плазменной полимеризации на электродной поверхности. Из этих методов нанесение пленки поливанием или при опускании электрода в раствор имеет то преимущество, что перед нанесением на электрод полимер растворяют в подходящем растворителе (как перед покраской), и можно предварительно охарактеризовать его физические свойства. С другой стороны, достоинством электрохимической полимеризации является легкость получения пленки и возможность контроля ее толщины. Более подробное описание этих подходов можно найти в обзорах [2, 66].

Выяснив, что существует множество методов химической модификации электродов и что число их непрерывно растет, можно начать подбирать подходящие поверхности электродов для конкретных электрохимических реакций. В качестве примера рассмотрим электрохимическое окисление β -никотинамидадениндинуклеотида (NADH) в обладающий ферментативной активностью NAD^+ . Значительный интерес к этой реакции обусловлен тем, что очень многие ферменты дегидрогеназы (более 250) используют в качестве кофермента NAD^+ или сходный с ним β -никотинамидадениндинуклеотид-фосфат ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$). Такие дегидрогеназы катализируют реакции типа



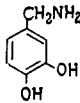
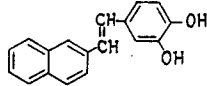
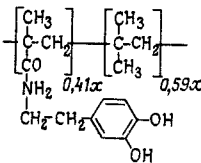
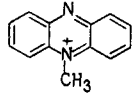
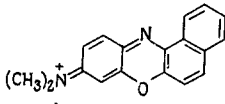
где SH_2 — субстрат и S — продукт реакции.

Если образуемый в таких реакциях NADH вновь окисляется электрохимически и достаточно эффективно, то на основе этих реакций можно создавать амперометри-

ческие ферментные электроды, селективные к субстрату выбранной дегидрогеназы (гл. 15). Большое преимущество рассматриваемого подхода состоит в том, что достаточно всего лишь заменить используемую дегидрогеназу, чтобы получить множество разнообразных сенсоров. К сожалению, «чистые» (немодифицированные) металлические или углеродные электроды непригодны для окисления NADH. Как показано в работе [33], на чистых электродах NADH окисляется только при высоких (около 1 В) перенапряжениях. В этих условиях окисление протекает с образованием промежуточных радикальных соединений. Таким образом, чисто металлические электроды непригодны по двум причинам. Во-первых, параллельно с регенерацией NAD^+ образуются димеры и другие продукты. Во-вторых, из-за необходимости высокого перенапряжения возникает проблема мешающего влияния других частиц, присутствующих в анализируемом растворе.

В попытках преодолеть эти трудности исследовали множество различных модифицированных электродов, на которых повторное окисление NADH протекает с участием иммобилизованного медиатора, а не непосредственно на поверхности электрода. В табл. 13.1 приведено несколько различных способов модификации электродов,

Таблица 13.1. Модифицированные электроды для окисления NADH

Медиатор	Литература	Примечание
	[78]	Монослой. Потеря активности через несколько циклов
	[48]	Монослой. Потеря 70% активности через 30 мин
	[31]	Полимер. Затруднен транспорт через пленку. В цикле превращений активность падает
	[77]	Электрохимическое осаждение. Потеря 60% активности за 2 ч
	[37]	Адсорбированный слой. Потеря 50% активности за 10 ч при pH 7

описанных в литературе. Среди них как монослойное покрытие электродов путем адсорбции орто-хинонов [48, 78], так и многослойное покрытие на основе полимерных орто-хинонов [31]. Кроме того, авторы [77] изучили электрохимическое осаждение

N-метилфеназина. Во всех случаях был достигнут определенный прогресс в каталитическом окислении NADH. На модифицированном электроде перенапряжение заметно снижается, смягчая, таким образом, проблему помех. Однако во всех случаях модифицированные электроды оказались недостаточно стабильными для продолжительного использования либо вследствие побочных реакций медиатора, либо из-за утечки медиатора с поверхности электрода. По этим причинам такие электроды непригодны для использования в амперометрических сенсорах.

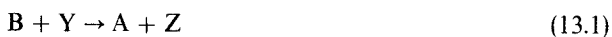
Недавно Гортон и др. [38] сообщили о результатах окисления NADH на графитовом электроде, на котором адсорбирован 1,2-бензофеноксазин-7-он. Авторы детально изучили кинетику этой реакции с помощью вращающегося дискового электрода. Они нашли, что в диапазоне pH 1,1–7,0 активность заметно не меняется в течение 7 ч, а при pH 8,0 за тот же период уменьшается на 17%. Ключ к решению проблемы стабильности нашли Элбери и Бартлетт [1], показавшие, что в качестве электрода можно использовать проводящие в одном измерении соли, образованные N-метилфеназином и тетрацианохинодиметаном. При изготовлении электродов из этого материала не возникает проблем со стабильностью, в отличие от других подходов.

13.2. Кинетика в системах с модифицированными электродами

Для рационального проектирования модифицированных электродов специального назначения необходимо: хотя бы приблизительно знать, каковы, во-первых, механизм и кинетика соответствующей гомогенной окислительно-восстановительной реакции; во-вторых, электрохимические свойства медиатора; и в-третьих, необходимо иметь общее представление об электрохимических свойствах модифицированных электродов. Только тогда можно с уверенностью предсказать наиболее вероятное влияние иммобилизации на кинетику и термодинамику реакций с участием медиатора.

Наряду с разработкой способов модификации электродов не меньший интерес представляют и различные методы их изучения, как электрохимические, так и спектроскопические. В этой главе мы остановимся только на электрохимических методах исследования стационарных и переходных процессов на модифицированных электродах. Спектроскопические методы изучения электродных поверхностей *in situ* обсуждаются в недавно опубликованном обзоре [74]. Чтобы дать сравнительную оценку различных методов, начнем с рассмотрения транспорта и кинетики в модифицированных электродах.

Подробное математическое описание реакций на химически модифицированных электродах приводится в работах [3, 4, 14]. Эти модели предложены для самого общего случая модифицированного электрода с многослойным покрытием и позволяют идентифицировать ряд возможных скоростьюопределяющих стадий. Электроды с монослойным покрытием представляют собой частный случай этой общей модели. Теоретические подходы в работах [3, 4, 14] почти идентичны, а выводы хорошо согласуются. Для наших целей удобно воспользоваться обозначениями Элбери и Хиллмана [4]. На рис. 13.2 в общем виде показана модель модифицированного электрода с покрытием. В этой модели предполагается наличие медиаторной пары A/B, иммобилизованной равномерно в слое толщиной L на поверхности электрода. Медиатор реагирует с присутствующим в растворе субстратом Y, в результате чего образуется продукт Z:



Затем медиатор электрохимически окисляется (или восстанавливается), и регенерированная форма B готова реагировать с еще одной молекулой субстрата из раствора. Позже мы увидим, что ряд кинетических процессов действительно описывается данной

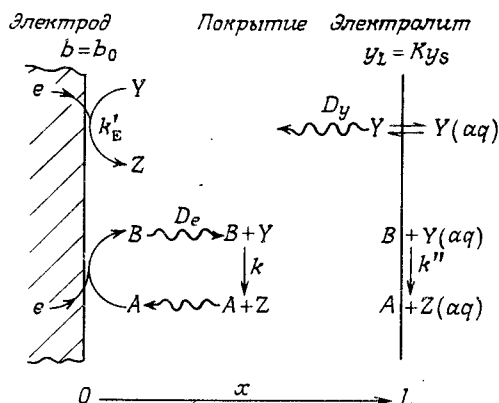


Рис. 13.2. Обобщенная модель модифицированного электрода и принятые в ней обозначения. Показаны четыре основных процесса: реакция на поверхности электрода (k'_E), распределение субстрата в пленке (K), реакция с участием медиатора в пленке (k), реакция с участием медиатора на поверхности (k''). (С разрешения авторов [4].)

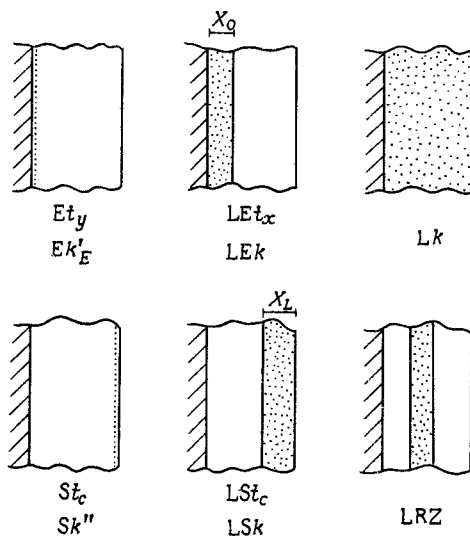
общей схемой. И именно относительные величины характеристических констант скоростей этих процессов определяют поведение модифицированных электродов.

На рис. 13.2 показаны различные процессы, которые могут быть скоростьюопределяющими для данного модифицированного электрода. Диффузия электронов внутри слоя, осуществляющаяся, по-видимому, путем перескока электрона между редокс-центрами, характеризуется коэффициентом диффузии D_e [30, 69, 70]. Для протекания реакции в модифицирующем слое субстрат должен проникнуть в слой и диффундировать в нем. Поведение субстрата в слое характеризуется коэффициентом распределения K и коэффициентом диффузии D_y . Элбери и Хиллман различают три возможных типа реакций субстрата и характеризуют каждую из них своей константой скорости. Первый тип — это реакция субстрата с медиатором на внешней поверхности слоя (константа скорости k''). Второй — та же реакция внутри слоя (k). И наконец, реакция может происходить непосредственно на поверхности электрода (k'_E). Различие между первыми двумя случаями обусловлено разной сольватацией частиц на поверхности и внутри слоя. В этих моделях предполагается, что реакция с переносом электрона между медиатором A/B и электродом протекает быстро. Тогда поверхностная концентрация медиатора B (k_0) задается потенциалом электрода. В работе [15] это допущение обсуждается в рамках теории Маркуса.

Внутри слоя можно выделить два различных процесса переноса. Электроны, уходящие с электрода (слева на рис. 13.2), превращают A в B и скачками перемещаются внутри слоя. Субстрат Y переходит в слой из раствора (справа на рис. 13.2) и диффундирует в нем. Превращение субстрата в продукт реакции при помощи медиатора — реакция (13.1) — происходит тогда, когда встречаются две частицы, диффундирующие с разных сторон слоя. Область, где это происходит, называется реакционной зоной. Расположение реакционной зоны и ее толщина определяются относительной скоростью переноса обеих частиц в слое и скоростью реакции (13.1). Таким образом, если диффузия электронов в слое значительно быстрее, чем диффузия субстрата, то реакция скорее всего протекает вблизи границы раздела раствор/слой. Если же, наоборот, субстрат диффундирует через слой значительно быстрее, чем электрон, то реакционная зона должна располагаться вблизи границы раздела электрод/слой.

Полный теоретический анализ проблемы позволяет выделить десять возможных случаев, связанных с шестью вариантами расположения реакционной зоны. Эти шесть вариантов показаны на рис. 13.3. На всех схемах, приведенных здесь, электрод находится слева, а реакционная зона обозначена точками. На рисунке также даны обозначения, предложенные Элбери и Хиллманом для каждого из десяти случаев. В этих обозначениях заглавные буквы указывают область локализации реакционной

Рис. 13.3. Десять возможных случаев локализации реакции в модифицирующей пленке и их обозначение. На каждой схеме электрод показан слева, а реакционная зона выделена точками.



зоны, а следующие за ними строчные буквы характеризуют различные скоростьопределяющие процессы. Расшифровка этих обозначений приведена в табл 13.2. Так, например, комбинация LSt_c означает, что реакционная зона располагается вблизи поверхности слоя, и это положение определяется транспортом электронов через слой. Для получения более детальных сведений рекомендуем обратиться к оригинальным работам.

Таблица 13.2. Система обозначений для модифицированных электродов

Символ	Значение
<i>Расположение реакционной зоны</i>	
L	Слой
LS	Поверхностный слой
LE	Слой вблизи электрода
S	Поверхность
E	Электрод
LRZ	Реакционная зона внутри модифицирующего слоя
<i>Скоростьопределяющий процесс</i>	
t_y	Транспорт субстрата
t_e	Перенос электронов
k''	Поверхностная реакция
k	Реакция в слое
k'_E	Электродная (электрохимическая) реакция

Вернемся к рис. 13.3. Видно, что если изготовить электрод, в котором транспорт субстрата через слой происходит намного быстрее, чем транспорт электронов, то реакционная зона находится вблизи электрода (случаи Et_y , Ek'_E , LEt_x и LEk). Где именно протекает реакция, на электроде (случаи Et_y и Ek'_E) или же в зоне толщиной X_0 вблизи электрода, зависит от соотношения констант скоростей k'' и k'_E . С другой стороны, если принять меры, чтобы транспорт электронов через слой был быстрее транспорта субстрата, то реакция будет протекать на внешней стороне слоя (случаи St_c ,

Sk'' , LSt_e и Lsk). Будет ли она протекать прямо на поверхности (случаи St_e или Sk'') или же в слое толщиной X_L вблизи поверхности (случаи LSt_e или Lsk), зависит от соотношения констант скоростей k и k'' . Наконец, может оказаться, что обе компоненты, связанные с переносом, уравниваются друг друга. Тогда мы имеем два последних случая — Lk и LRZ , когда реакция протекает в объеме слоя.

Для медленной реакции реакционная зона охватывает весь слой (Lk). В противном случае (большие значения k) реакция протекает лишь в узкой зоне, в которой встречаются реагенты (LRZ).

Уравнения для токов, соответствующие различным случаям, можно найти в оригинальных работах [3, 4, 14].

Рассмотренные теоретические модели важны для разработки биосенсоров, поскольку они позволяют выделить ряд подходов к обеспечению оптимальных условий для катализа любой заданной реакции [4]. Элбери и Хиллман [4] выделяют два различных подхода соответственно для случаев Sk'' и Lsk . В случае протекания реакции на межфазной границе (Sk'') для того, чтобы модифицированный электрод обладал заметными каталитическими свойствами, значение k_2 (константа скорости гомогенной медиаторной реакции второго порядка) должно быть больше $10^4 \text{ дм}^3 \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. В этих условиях реакция протекает на границе слой/раствор, и поэтому толщина слоя не имеет значения. На практике же, чем толще слой, тем более вероятно, что транспорт электронов через него будет затруднен, так что разумно использовать монослойный электрод. С другой стороны, при протекании реакции в слое (Lsk) толщина последнего имеет большое значение. В идеале толщина слоя должна равняться толщине реакционной зоны X_L , а k_2 должна быть больше $10^3 \text{ дм}^3 \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Неудивительно, что в данном случае требуется значение k_2 меньше, чем в предыдущем, поскольку теперь в реакции принимают участие значительно большее число каталитических центров. Однако для реализации этого преимущества коэффициент диффузии субстрата в слое должен быть достаточно велик ($D_y \sim 10^{-6} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$). Это в свою очередь предполагает довольно открытую, пористую структуру слоя, что серьезно осложняет разработку слоистых электродов для катализа биоэлектрохимических редокс-реакций, особенно с участием больших молекул, например редокс-ферментов.

Интересно, что до сих пор во всех исследованиях скорость гомогенной реакции между медиатором и субстратом служит хорошим ориентиром для оценки скорости гетерогенной реакции на электроде или в слое. Существование корреляции между скоростями гомогенных и гетерогенных реакций очень важно, поскольку это означает возможность целенаправленной разработки новых модифицированных электродов на основе данных о соответствующих гомогенных медиаторах. Примером такого подхода является работа [53], посвященная медиаторам для окисления NADH .

Проведение электрохимических окислительно-восстановительных реакций в растворе с участием медиаторов — не единственная область применения модифицированных электродов. Представляет интерес также их использование для контроля вывода лекарств, конструирования ионных затворов и микроэлектронных устройств [76].

Применение модифицированных электродов для контролируемого вывода лекарств предполагает прежде всего создание электрода, позволяющего перевести лекарственное или другое представляющее интерес соединение в связанное состояние, причем таким образом, чтобы его высвобождение можно было контролировать электрохимически. С этой целью на практике используют как электростатическое удерживание, так и ковалентное связывание. В принципе такая система может по требованию выделять контролируемую дозу лекарства в определенных точках или областях. При этом скорость выделения и количество выделенного лекарства, а также интервалы между отдельными дозами контролируют электрохимически. В ряде работ Миллера и соавторов [57, 58, 80] исследовано контролируемое высвобождение веществ из электродов,

модифицированных полимерами. В данных работах авторы сосредоточились на модифицированных электродах для вывода нейротрансмиттера допамина. С этой целью готовили полимер, состоящий из основы, к которому прикрепляли допаминовые группы с помощью ковалентных связей, расщепляемых на катоде. Полимер представлял собой полистирол с боковыми изоникотинатными группами. Допамин присоединяли к этим группам посредством амидных связей [57]. Найдено, что если нанести такое покрытие на электрод из стеклоуглерода, окуная его в раствор полимера, то при наложении потенциала $-1,2$ В (относительно н.к.э.) допамин выделяется в раствор. Есть данные, что таким же образом можно высвобождать глутаминат и γ -аминомасляную кислоту [58].

Для разработки таких модифицированных электродов, как и в описанных выше случаях, важно иметь представление о транспорте и кинетике процессов. Миллер и соавторы нашли, что скорость прохождения заряда через пленку (D_e) слишком низка, чтобы обеспечить желаемые скорости высвобождения нейротрансмиттеров, и что это ограничивает количество выделяемого нейротрансмиттера. Проблема медленного распространения заряда по полимерным слоям является общей для слоев с непроводящей полимерной основой, особенно если используют двухэлектронные медиаторные группы. Один из путей решения этой проблемы заключается в том, чтобы сделать полимерную основу проводящей. В литературе имеется много работ по проводящим полимерам, получаемым электрополимеризацией гетероциклических ароматических мономеров (см., например, [21, 26, 32]). Хотя большинство этих работ выполняли для неводных растворителей, проводящие полимерные пленки можно растить и из водных растворов. В работе [80] применили проводящие полимеры для решения проблемы контролируемого выделения. С этой целью авторы использовали полипирроловую пленку с введенным путем ионного обмена глутаминатом (таким образом, связь глутамината с пленкой была электростатической). При наложении на электрод с пленкой катодного потенциала полипиррол восстанавливается, при этом он начинает отталкивать от себя глутаминатные противоионы. Использование проводящего полимера позволило избежать этих трудностей с переносом заряда и добиться выделения больших количеств нейротрансмиттеров в одиночном или повторяющихся импульсах.

Проводящие полимеры применяют также для изготовления ионных затворов с электрохимическим контролем [27, 28]. Принцип ионного затвора весьма схож с тем, что используется для контролируемого высвобождения глутамината. В непроводящей (восстановленной) форме полипиррол незаряжен и непроницаем как для анионов, так и катионов. Окисленный полимер становится проводящим, и в этой форме он заряжен положительно. Заряженный полимер обладает селективной проницаемостью; иными словами, анионы теперь проникают в пленку значительно легче, чем катионы. Авторы [27, 28] использовали это свойство для создания ионного затвора для хлорид-ионов. Они покрыли полипирролом золотой сетчатый электрод так, чтобы получилась сплошная пленка без разрывов. В нейтральной непроводящей форме эта пленка непроницаема для ионов. При окислении пленка переходит в заряженную форму и становится проницаемой для хлорид-ионов. Таким образом, была создана мембрана, которую можно электрохимически переключать между состояниями проницаемости и непроницаемости для хлорид-ионов.

Как видим, модифицированные электроды начинают находить применение в самых различных разделах биохимии. Для успешного развития данной области при проектировании электродов необходимо применять рассмотренные выше критерии. Важно также уметь охарактеризовать различные скоростьопределяющие процессы и свойства модифицированного электрода. Теперь мы вернемся к различным электрохимическим методам изучения модифицированных электродов.

13.3. Электрохимические измерения в стационарном состоянии

Электрохимические измерения в стационарном состоянии широко применяют для исследования модифицированных электродов благодаря относительной простоте требуемой аппаратуры. Для получения информации о степени покрытия электрода и кинетике электродных реакций особенно удобно использовать циклическую вольтамперометрию и более сложные варианты: импульсную и переменноточковую модуляционную вольтамперометрию. Кроме того, при исследовании кинетики процессов переноса заряда внутри слоя на систему нередко налагают ступенчато изменяющийся потенциал.

13.3.1. Циклическая вольтамперометрия

В обычной циклической вольтамперометрии на электрод налагают треугольные импульсы потенциала и регистрируют получающийся ток. Этот метод широко применяют при исследовании электрохимии растворенных веществ [43] и изучения электрохимических реакций с последующими химическими превращениями (гл. 14). Его активно используют и при исследовании модифицированных электродов. На рис. 13.4, а приведены типичные циклические вольтамперограммы электрода, модифицированного трис(бипиридиловым) комплексом рутения, при различных скоростях развертки. Подобные зависимости часто служат для оценки степени покрытия поверхности электрода иммобилизованными электроактивными частицами. Такие оценки получают путем интегрирования анодных и катодных токов модифицированного электрода в индифферентном электролите, когда единственным фарадеевским процессом является окисление или восстановление иммобилизованной редокс-группы. При этом необходимо учитывать вклад тока заряжения двойного слоя. Обычно его оценивают «на глазок», поскольку точно измерить ток заряжения невозможно. Иногда можно руководствоваться величиной наблюдаемого тока заряжения двойного слоя на «чистом» электроде в аналогичных условиях. Однако этот подход следует применять

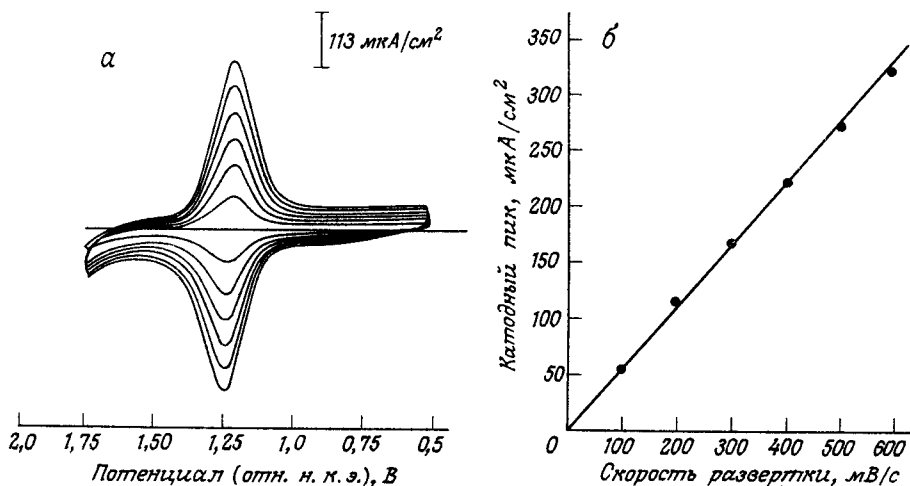


Рис. 13.4. а: Циклические вольтамперограммы платинового электрода, силанизированного нанесением $Ru(bipy)_3^{2+}$ в $0,1$ моль/дм³ растворе ТВАР в ацетонитриле (электроактивное покрытие в ~ 21 монослой). б: Зависимость высоты пика от скорости развертки ([36], с разрешения издателя, The Electrochemical Society, Inc.).

с осторожностью, так как модифицирование может изменить структуру двойного слоя. Заряд, полученный интегрированием пика циклической вольтамперограммы, даст точную оценку общей степени заполнения поверхности лишь в том случае, если в процессе измерения успевает реагировать вся поверхностная пленка, а не только несколько ее внутренних слоев. К счастью, проверить это довольно просто. Если процесс контролируется кинетикой и в окислительно-восстановительную реакцию вступает только часть покрытия, то измеряемый суммарный заряд зависит от скорости развертки – чем медленнее развертка, тем больше время реакции и, следовательно, тем большая часть пленки будет реагировать. Это, в частности, проявляется в зависимости высоты пика от скорости развертки. Если скоростьюопределяющей стадией является диффузионный перенос внутри пленки, высота пика меняется пропорционально корню квадратному из скорости развертки ($v^{1/2}$) и определяется точно тем же выражением,

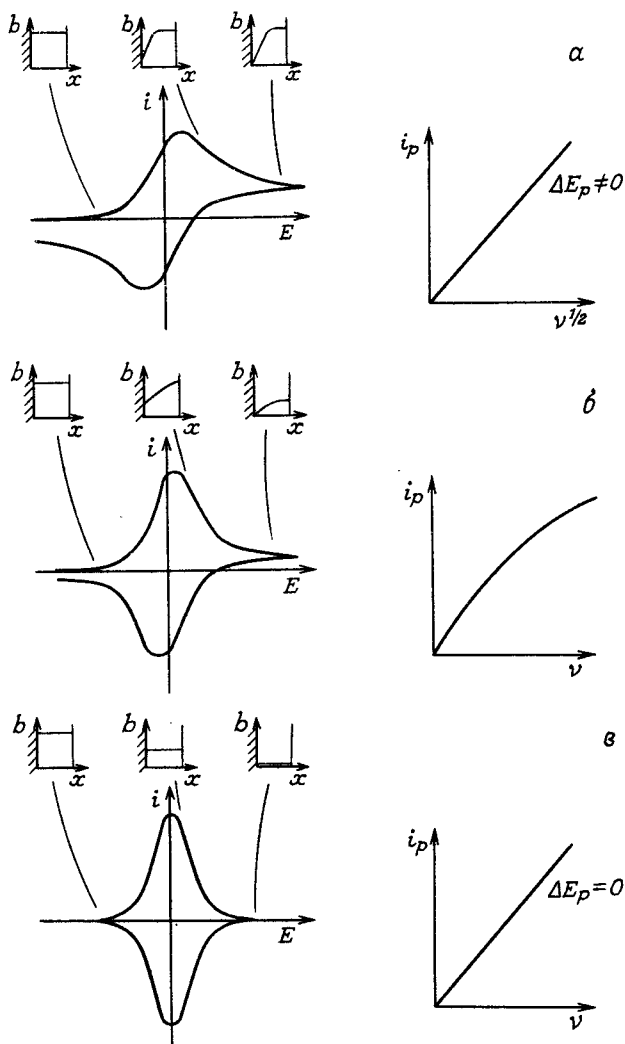


Рис. 13.5. Циклические вольтамперограммы модифицированных электродов (слева) и соответствующие им зависимости высоты пика от скорости развертки (справа) при переходе от линейной диффузии в полубесконечном пространстве (а) через промежуточную ситуацию (б) к поверхностной реакции (в). Показаны также концентрационные профили в пленке. а – расстояние между пиками зависит от скорости развертки; в – не зависит.

что и полубесконечная линейная диффузия частиц в гомогенном растворе [30]:

$$i_p = 0,4463 (nF)^{3/2} A D_c^{1/2} v^{1/2} b_0 / (RT)^{1/2}, \quad (13.2)$$

где i_p – высота пика тока; n – число переносимых электронов; A – площадь электрода; F – число Фарадея; D_c – коэффициент диффузии частиц, переносящих заряд в пленке. При отсутствии диффузионных ограничений высота пика меняется прямо пропорционально скорости развертки (рис. 13.4, б). Таким образом, по характеру зависимости высоты пика от скорости развертки можно судить о свойствах модифицированного электрода. В определенных условиях при увеличении скорости развертки может наблюдаться переход от зависимости $i_p \sim v$ к $i_p \sim v^{1/2}$ (см., например, [69]), что вызвано взаимосвязью скорости развертки и кинетики переноса заряда через пленку. На рис. 13.5 приведены типичные циклические вольтамперограммы модифицированного электрода и соответствующие концентрационные профили в редокс-пленке. В изящной серии экспериментов на электроде, модифицированном поливинилферроценом, Даум и др. [30] показали, что изменение характера зависимости $i_p(v)$ может быть вызвано также уменьшением скорости переноса заряда при охлаждении от 20 до -70°C .

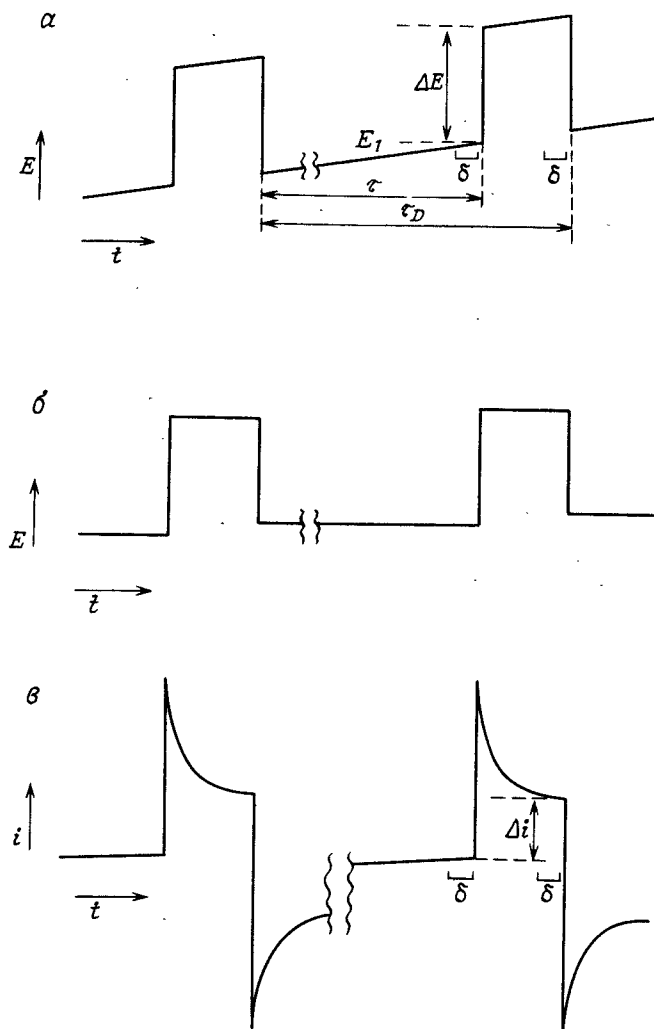
Значения потенциалов и формы пиков в циклической вольтамперометрии содержат также информацию о кинетике переноса заряда. В случае быстрого процесса, когда весь слой находится в равновесии с электродом, можно ожидать, что расстояние между пиками ΔE на прямом и обратном ходе развертки будет равно нулю [19]. На практике это редко наблюдается даже для модифицированных электродов с монослойным покрытием. В общем случае для таких электродов с увеличением скорости развертки расстояние между пиками возрастает, тогда как средний потенциал остается практически неизменным. Циклические вольтамперограммы имеют самую разнообразную форму, анализ которой пока не проводился. Вообще процессы, протекающие в многослойно модифицированных электродах, более сложны. На поведение электродов влияют такие факторы, как набухание модифицирующего слоя в водном растворе, перенос компенсирующих противоионов, взаимодействие между самими редокс-группами. Предложена модель взаимодействия редокс-групп, в которой учитываются коэффициенты активности [24]. Детальный математический анализ формы циклических вольтамперограмм для модифицированных электродов можно найти в работе [18] и в серии работ Лавирона и др. [59–63].

13.3.2. Импульсная полярография

Недостатком циклической вольтамперометрии как метода изучения модифицированных электродов является невысокое разрешение, ограниченное вкладом заряжения двойного электрического слоя в наблюдаемый ток. Это может быть особенно важно при низком заполнении поверхности иммобилизованными ферментами или субмонослойном покрытии электрода редокс-частицами. Один из путей преодоления этой проблемы заключается в использовании метода импульсной полярографии и, в частности, дифференциальной импульсной полярографии. В течение ряда лет эти методы успешно применяют для определения малых концентраций ионов металлов в растворах [19, стр. 190; 68] и для изучения электрохимических свойств биологических редокс-частиц в растворах. Благодаря относительной легкости получения импульсов требуемой формы, регистрации и интерпретации соответствующих токов в импульсной полярографии успешно используют электрохимическую аппаратуру, оснащенную микропроцессорами. Поэтому можно ожидать, что в последующие несколько лет популярность этих методов будет возрастать.

Принцип импульсной полярографии иллюстрируется рис. 13.6. Серию импульсов

Рис. 13.6. Принцип дифференциальной импульсной полярографии. а — форма импульсов потенциала с соответствующими обозначениями; б — форма импульсов, используемая с цифровой аппаратурой; в — наблюдаемый сигнал системы.



потенциала с амплитудой ΔE (обычно от 5 до 50 мВ) налагают на медленную развертку потенциала ($\sim 1 \text{ мВ} \cdot \text{с}^{-1}$). Импульсы повторяются через время τ_D и имеют длительность $(\tau_D - \tau)$ (период τ_D часто называют «временем капания»; этот термин восходит к родоначальному методу с использованием ртутного капяющего электрода). Ток измеряют в течение фиксированных интервалов времени δ непосредственно перед началом и перед самым концом импульса, как показано на рис. 13.6. Дифференциальная импульсная полярограмма, таким образом, представляет собой зависимость разности значений этих двух токов от базового потенциала E_1 . При использовании цифровой техники более удобна простая форма импульсов, показанная на рис. 13.6, б, тем более что именно этот случай обычно анализируют теоретически [22]. Браун и Ансон [24] сравнили результаты исследования монослойно модифицированного электрода методами циклической вольтамперометрии и дифференциальной импульсной полярографии. На рис. 13.7 приведены некоторые данные этих авторов для модифицированного ковалентно связанным пентаминным комплексом рутения элект-

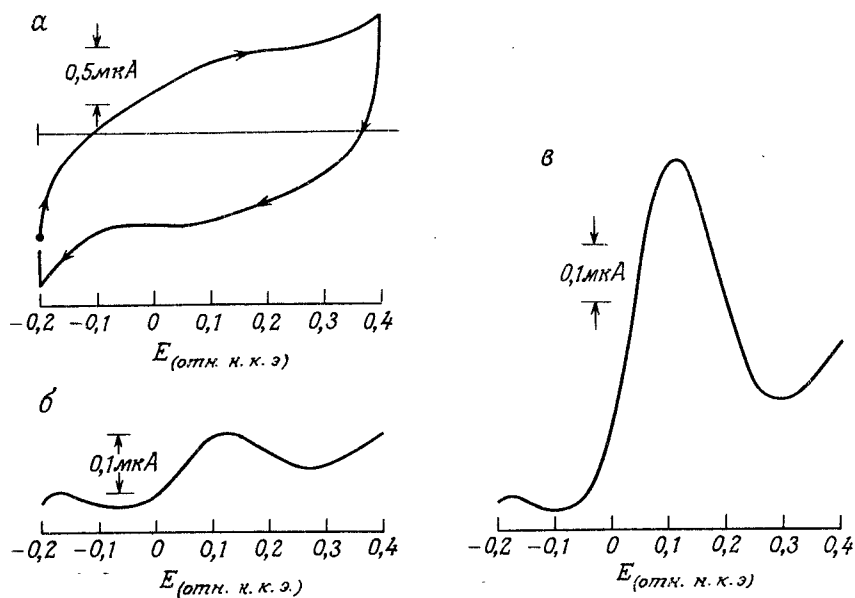


Рис. 13.7. Циклическая (а) и дифференциальные импульсные (б, в) вольтамперограммы для электрода из пиролитического графита, к поверхности которого ковалентно прищито $4,2 \cdot 10^{-1}$ моль пентамина рутения (II); (электролит — 1 моль/дм³ CF₃COOH [24]). (С разрешения журнала *Analytical Chemistry*. © 1977 American Chemical Society.). а — 50 мВ/с; б — $R_u \sim 100 \text{ Ом}$; в — $R_u \sim 1000 \text{ Ом}$.

трода из пиролитического графита. Как видно, дифференциальная импульсная полярография более пригодна для исследования электродов с низкими заполнениями поверхности.

В случае монослойно модифицированного электрода модель фарадеевского процесса с участием связанных на поверхности частиц можно представить в виде псевдоемкости, присоединенной параллельно емкости двойного слоя. Браун и Ансон [24] теоретически рассчитали дифференциальную импульсную полярограмму, используя эту модель и полагая, что связанная на поверхности редокс-пара дает нернстовский отклик. Иными словами, авторы считают, что перенос электрона происходит быстро, и поэтому соотношение концентраций окисленных и восстановленных частиц на поверхности связано с потенциалом уравнением Нернста. Это предположение выполняется не всегда, поэтому рассматриваемую модель следует с осторожностью применять к другим модифицированным электродам, особенно к электродам с многослойным покрытием (из-за диффузионных ограничений в пленке). В модели Брауна и Ансона заряджение двойного слоя и перенос заряда к связанным на поверхности редокс-частицам осуществляется через нескомпенсированное сопротивление раствора, как показано на рис. 13.8. В этих условиях ток, текущий в цепи после каждого импульса, можно представить как

$$i = \frac{\Delta E}{R_u} \exp - \left[\frac{t}{R_u (C_{dl} + C_F)} \right], \quad (13.3)$$

где R_u — нескомпенсированное сопротивление раствора; C_{dl} — емкость двойного слоя; C_F — фарадеевская псевдоемкость и t — время от начала импульса. С помощью такого

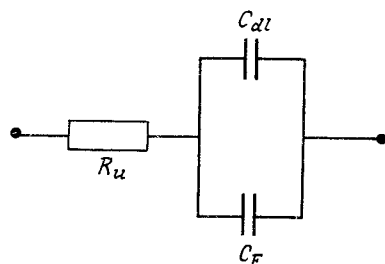


Рис. 13.8. Простая эквивалентная цепь, моделирующая необратимое присоединение реагента [24].

удобного и простого приема, как введение дополнительного некомпенсированного сопротивления, автору удалось усилить чувствительность метода за счет увеличения RC -постоянной цепи и замедления процесса заряжения емкости.

Полное описание вида дифференциальной импульсной полярограммы требует четкого представления о емкости двойного слоя и ее зависимости от потенциала. Пока что такой анализ источен и весьма проблематичен из-за неясности происхождения фоновых токов и возможных изменений, вызванных самим процессом модификации поверхности. Однако метод полезен для обнаружения покрытий с низким заполнением, а значения потенциалов пиков могут дать ценную информацию о стандартном потенциале закрепленной на поверхности редокс-пары. При выборе экспериментальных параметров требуется соблюдать известную осторожность. Так, при неудачном выборе скорости развертки могут появляться ложные пики. Поэтому прежде, чем сделать вывод о том, что потенциалы наблюдаемых пиков точно совпадают со стандартными потенциалами поверхностных редокс-частиц, разумно проверить постоянство положения пиков, изменяя условия эксперимента.

Дифференциальную импульсную полярографию используют для исследования ферментов, иммобилизованных на поверхности электродов, когда из-за низкого заполнения поверхности циклическая вольтамперометрия не пригодна. Этим методом исследовали также [44, 45] электрохимические свойства флавопротеинов, ковалентно присоединенных к графитовым электродам с помощью цианурхлорида. Авторы наблюдали сдвиги положений пиков окисления/восстановления простетической флавиновой группы при присоединении к электродам глюкозооксидазы, ксантинооксидазы и D- и L-аминокислотной оксидазы, а также влияние удаления или последовательного замещения флавиновых группировок.

Для изучения электродов, модифицированных полимерами, используют близкий к рассмотренному метод обычной импульсной полярографии [69, 71]. В этом методе

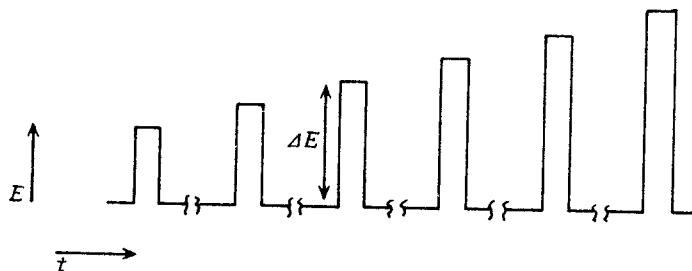


Рис. 13.9. Форма импульсов потенциала, используемых в обычной импульсной полярографии.

на электрод подают серию импульсов возрастающей амплитуды при одном и том же базовом потенциале, при котором реакция практически не протекает [19, стр. 186]. Форма импульсов показана на рис 13.9. Импульсная полярограмма представляет собой зависимость тока, измеряемого перед концом каждого импульса, от потенциала.

13.3.3. Переменноточковая вольтамперометрия

В приложении к модифицированным электродам с низким заполнением поверхности переменноточковая вольтамперометрия имеет определенные преимущества перед обычной циклической вольтамперометрией, как и дифференциальная импульсная полярография. В переменноточковой вольтамперометрии медленную развертку приложенного к электроду потенциала модулируют синусоидальным сигналом малой амплитуды. С помощью синхронного усилителя выделяют переменную компоненту измеряемого модулированного тока и строят ее зависимость от среднего приложенного потенциала. Данный метод применим для исследования электрохимии редокс-белков, адсорбированных на ртутном электроде [46, 47, 50, 51]. Теория переменноточкового вольтамперометрического сигнала модифицированных электродов этого типа представлена в работе [49].

13.3.4. Ступенчатая хроноамперометрия

В описанных выше методах исследования электродов в стационарном состоянии на систему воздействуют повторяющимися импульсами потенциала определенной формы. Для получения данных о кинетике переноса заряда через полимерные слои связанных редокс-частиц на модифицированных электродах нередко используют и отдельные ступенчатые изменения потенциала. В экспериментах этого типа наложенный на стационарный электрод в фоновом электролите начальный потенциал E_1 скачком меняется до конечного потенциала E_2 ; соответствующий этому ток регистрируют как функцию времени. На рис. 13.10 показан типичный переходный ток электрода с тиониновым покрытием в 0,05 моль/л серной кислоте. Наложение ступеньки потенциала приводит к изменению окислительно-восстановительного состояния модифицирующей пленки, причем при малых временах основной вклад в измеряемый ток вносит зарядение емкости, а при больших – фарадеевский процесс в пленке. Следовательно, сигнал определяется диффузией в пленке и по существу идентичен току в случае тонкослойной ячейки. Использование преобразования Лапласа при решении уравнения второго закона Фика применительно к пленке толщиной L дает следующее выражение для переходного тока [67]:

$$i(t) = \left(\frac{D_e}{\pi t}\right)^{1/2} \frac{\Delta Q}{L} \left[1 + 2 \sum_{m=1}^{\infty} (-1)^m \exp\left(-\frac{m^2 L^2}{D_e t}\right) \right], \quad (13.4)$$

где ΔQ – изменение заряда пленки и D_e – коэффициент диффузии заряда через пленку. Выражение (13.4) представляет собой модифицированную форму уравнения Коттрелла [19, стр. 143]. Переходный ток легче всего анализировать при помощи графика зависимости i от $t^{1/2}$, как показано на рис. 13.11. При малых временах ($t \ll DL^2$), когда концентрационная поляризация внутри покрытия не доходит до внешней поверхности, выражение (13.4) сводится к соответствующему уравнению Коттрелла для случая полубесконечной линейной диффузии:

$$i(t) = \left(\frac{D_e}{\pi t}\right)^{1/2} \frac{\Delta Q}{L}. \quad (13.5)$$

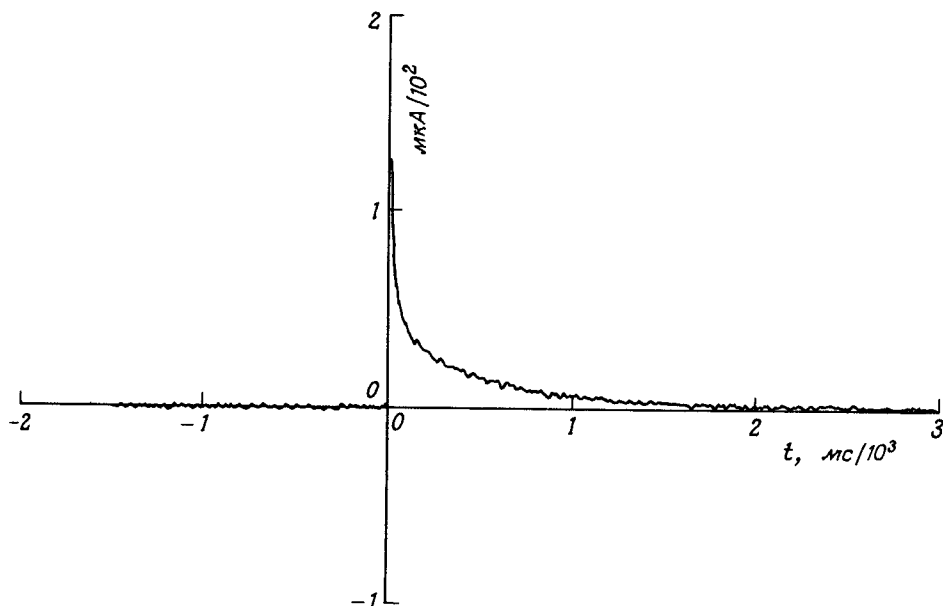


Рис. 13.10. Типичный релаксационный ток электрода с тиониновым покрытием в $0,05$ моль/дм³ H_2SO_4 при наложении ступеньки потенциала от -211 до -191 мВ отн н.к.э. (усреднение по восьми повторяющимся импульсам). Для регистрации использовали управляемый микропроцессором потенциостат.

При больших временах порядка $t \sim D/L^2$ концентрационная поляризация в пленке доходит до поверхности, и лимитируемый диффузией ток падает ниже значений, определяемых уравнением (13.5). Как видно из рис. 13.11, при больших временах, т. е. малых значениях $t^{-1/2}$, по мере увеличения вклада экспоненциальных членов в уравнении (13.4) график в координатах $i - t^{-1/2}$ действительно отклоняется от прямой, проходящей через начало координат. По наклону начального участка этой зависимости (область малых времен) из уравнения (13.5) можно найти значение D_e для исследуемой реакции (эффективный коэффициент диффузии заряда в пленке), если известны ΔQ и L . Обычно ΔQ находят интегрированием всего переходного тока, а L можно оценить по величине заполнения, определяемой методом циклической вольтамперометрии или каким-либо другим способом.

Иногда при очень малых временах наблюдаются отклонения от предсказываемой уравнением (13.5) линейной зависимости, обуславливаемые током заряжения двойного слоя [73]. Ряд исследователей (см., например, [66]) выступают за применение больших (> 500 мВ) скачков потенциала, перекрывающих область редокс-реакции на циклической вольтамперограмме исследуемой пленки. Следовать этим рекомендациям необходимо с осторожностью, так как при больших скачках потенциала значительные изменения редокс-состояния пленки могут приводить к явным изменениям в ее морфологии и сольватации, а также к осложнениям, связанным с токами заряжения двойного слоя. По опыту автора этой главы лучше покрывать область редокс-реакции в пленке, изменяя потенциал небольшими ($10-20$ мВ) скачками в прямом и обратном направлении и сопоставлять токовые кривые по получаемым значениям D_e . Основным источником погрешностей при оценке D_e этим методом часто становится определение входящей в уравнение (13.4) величины ΔQ . По этой причине при обработке эксперимен-

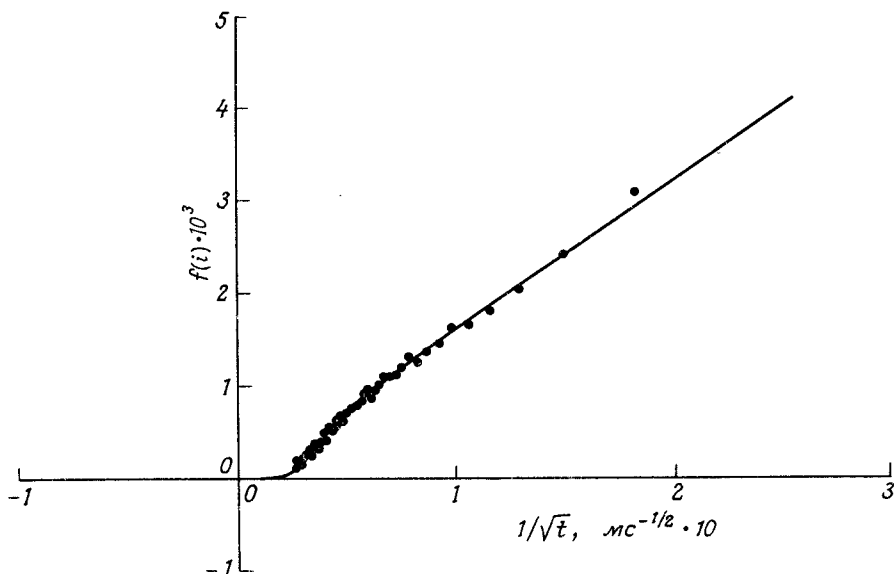


Рис. 13.11. Обработка переходного сигнала электрода с тиониновым покрытием, регистрируемого при ступеньке потенциала, в соответствии с уравнением Коттрелла. Кривая рассчитана по уравнению (13.4) при $D/L^2 = 0,813 \text{ с}^{-1}$ и $\Delta Q = 2,63 \cdot 10^{-5} \text{ К}$; $f(i) = i/\Delta Q$.

тальных данных всегда имеет смысл подгонять под них кривые, рассчитываемые по полному уравнению, а не полагаться на наклоны начальных участков.

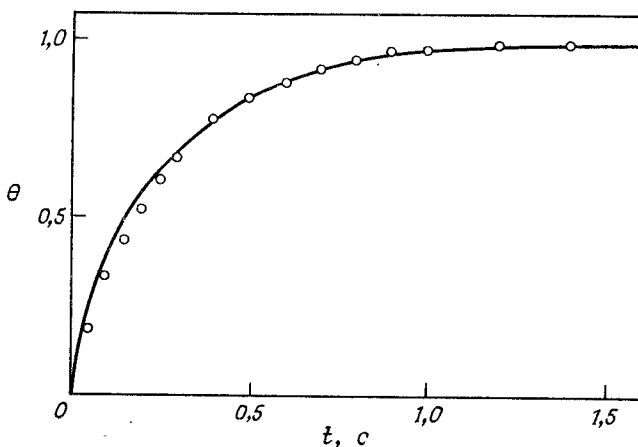
Механизм переноса заряда через полимерные пленки и природу скоростьопределяющего процесса изучали многие группы исследователей. Установлено, что в определенных случаях D_e зависит от природы противоионов. Так, изменение размера противоиона оказывает заметное влияние на значения D_e , получаемые на электроде с тиониновым покрытием [11]. В этом случае значения D_e лежат в диапазоне от $9,1 \cdot 10^{-13} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ для сульфат-иона до $0,9 \cdot 10^{-13} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ для тозилат-иона. Связь наблюдаемого значения коэффициента диффузии с различными скоростьопределяющими процессами обсуждается в работе [66].

В методе скачка потенциала измеряют переходный отклик электрода на возмущение потенциала. Для изучения переноса заряда и кинетики процессов в модифицированных электродах в комбинации с этим методом используют и множество других. Среди них необходимо отметить спектроскопический метод, позволяющий следить за изменением редокс-состояния модифицирующего покрытия во времени. Достоинство этого метода состоит в том, что он позволяет избежать проблемы фона, с которой приходится иметь дело при измерениях тока. Наиболее распространенный вариант спектроскопического метода заключается в наблюдении изменений в видимой области спектра с помощью прозрачного электрода из оксида олова, служащего подложкой для модифицирующего покрытия. Спектроскопические измерения отражают интегральные изменения редокс-состояния покрытия, описываемые интегральной формой модифицированного уравнения Коттрелла [11]:

$$\theta = \frac{A_t - A_0}{A_\infty - A_0} = 2 \left(\frac{D_0 t}{L^2 \pi} \right)^{1/2} + 2 \sum_{m=1}^{\infty} (-1)^m \left[2 \left(\frac{D_e t}{L^2 \pi} \right)^{1/2} \exp \left(- \frac{m^2 L^2}{D_e t} \right) - 2m \operatorname{erfc} \left(\frac{mL}{D_e^{1/2} t^{1/2}} \right) \right], \quad (13.6)$$

где A — оптическая плотность; нижние индексы 0, t и ∞ обозначают соответственно

Рис. 13.12. Переходный оптический сигнал электрода с тиоиновым покрытием. Сплошная кривая рассчитана по уравнению (13.6). (С разрешения авторов [11].)



начальный, текущий и бесконечный момент времени t ; L — толщина пленки; D_e — эффективный коэффициент диффузии.

На рис. 13.12 показан типичный экспериментальный график изменения во времени оптического сигнала электрода с тиоиновым покрытием. Изменения в полимерных покрытиях модифицированных электродов при скачке потенциала изучали также методом электронного спинового резонанса *in situ* [9]. С помощью этого метода авторы [9] смогли проследить изменение во времени концентрации связанных радикалов в электроде с покрытием из полинитростирола. Для интерпретации результатов использовали уравнение (13.6).

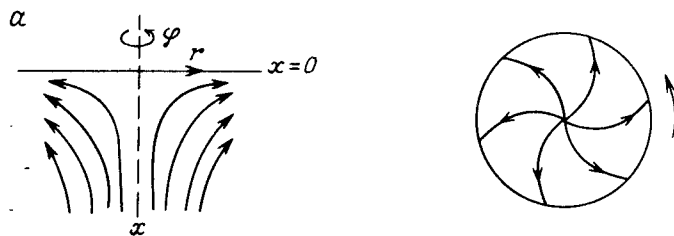
13.4. Методы, основанные на вынужденной конвекции

Во всех описанных выше методах упор делается на свойства самих модифицированных электродов и на кинетические процессы, протекающие в их покрытиях. Не менее важен и интересен вопрос о кинетике и механизме медиаторных реакций между связанными редокс-группами и субстратом, находящимся в растворе. Для его решения необходимо уметь рассчитывать поверхностную концентрацию субстрата. Для исследований такого типа идеально подходят электроды с вынужденной конвекцией, особенно вращающиеся дисковый электрод и дисковый электрод с кольцом. Возможность управлять гидродинамическими условиями в случае вращающихся электродов обеспечивает воспроизводимый, легко поддающийся расчету и экспериментальному контролю транспорт субстрата к поверхности электрода и продуктов от нее.

13.4.1. Вращающийся дисковый электрод

Теоретическая модель гидродинамики вращающегося диска впервые была предложена фон Карманом [79] и Кохреном [29]. Вращающийся электрод действует как насос, который всасывает свежую порцию раствора из объема к поверхности электрода, закручивает его и отбрасывает в сторону. Картина течения жидкости на вращающемся электроде показана на рис. 13.13. Вблизи поверхности электрода образуется стационарный пограничный слой, называемый диффузионным, который вращается вместе с электродом. Вне этого стационарного слоя раствор хорошо перемешивается. Толщина диффузионного слоя описывается выражением

$$X_D = 0,643D^{1/3}\nu^{1/6}W^{-1/2}, \quad (13.7)$$



б

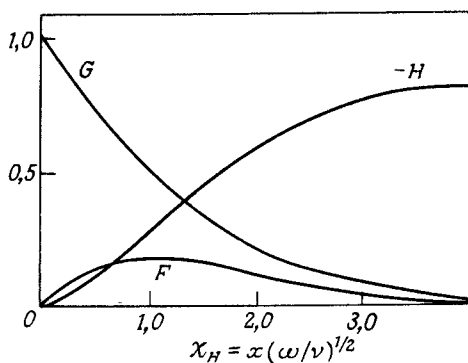


Рис. 13.13. Поток жидкости на вращающемся дисковом электроде. а—схема течения жидкости в системе; б—три составляющие скорости потока как функции расстояния от поверхности электрода: $v_{\phi} = r\omega G(\chi_H)$; $v_r = r\omega F(\chi_H)$; $v_x = (\omega/\nu)^{1/2} H(\chi_H)$, где ω —скорость вращения в $\text{рад} \cdot \text{с}^{-1}$.

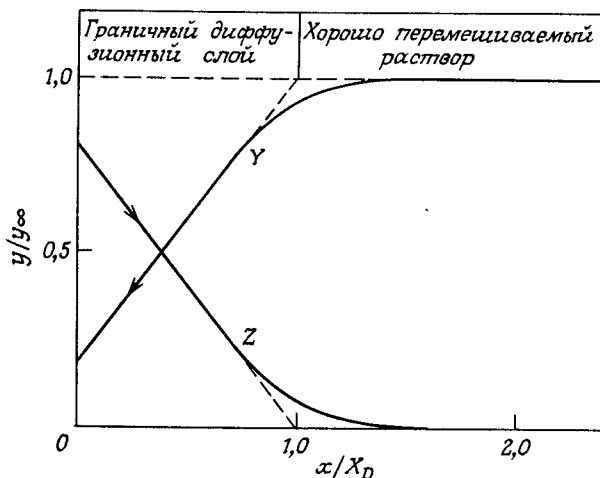
где D —коэффициент диффузии; ν —кинематическая вязкость (вязкость, деленная на плотность) и W —скорость вращения электрода, Гц. Уравнение (13.7) имеет две важные особенности. Во-первых, толщина диффузионного слоя зависит от скорости вращения и, таким образом, может варьироваться в эксперименте. Во-вторых, толщина не зависит от радиальной координаты, и таким образом стационарный слой однороден по толщине на всей поверхности электрода. Такой электрод называют равномерно доступным; плотность тока должна быть одинаковой по всей поверхности диска.

На рис. 13.14 показаны концентрационные профили для частиц Y , реагирующих на вращающемся дисковом электроде с образованием продукта Z . На расстояниях, больших X_D , раствор хорошо перемешивается, и концентрационная поляризация Y или Z отсутствует. В этой области транспорт вещества осуществляется преимущественно за счет конвекции. Если расстояние от поверхности электрода меньше X_D , раствор является стационарным и транспорт осуществляется в чисто диффузионном режиме. Поток частиц, реагирующих на поверхности электрода, j , определяется просто первым законом Фика:

$$j = \frac{D}{X_D}(y_{\infty} - y_0) = \frac{i}{nAF}, \quad (13.8)$$

где y_{∞} и y_0 —концентрации в объеме и на поверхности электрода соответственно; n —число переносимых электронов; A —площадь электрода и F —число Фарадея ($96480 \text{ Кл} \cdot \text{моль}^{-1}$). Поскольку X_D легко рассчитать по уравнению (13.7), а ток и концентрация вещества в объеме обычно известны, уравнение (13.8) можно использовать для нахождения поверхностной концентрации реагирующих частиц. Это существенный момент при изучении модифицированных электродов, поскольку именно эта концентрация важна при исследовании кинетики реакций с участием медиатора.

Рис. 13.14. Изменение концентрации при удалении от поверхности вращающегося дискового электрода.



Если поддерживать на электроде потенциал, при котором поверхностная концентрация субстрата уменьшается до нуля ($y_0 = 0$), то ток ограничен массопереносом. При этих условиях из уравнений (13.7) и (13.8) можно получить уравнение Левича для предельного тока:

$$i_L = 1,554nAFD^{2/3}\nu^{-1/6}y_\infty W^{1/2}. \quad (13.9)$$

Таким образом, предельный ток вращающегося дискового электрода пропорционален квадратному корню из скорости вращения: чем быстрее вращается электрод, тем тоньше неподвижный слой и тем эффективнее перенос вещества к поверхности электрода.

Следует особо рассмотреть возможное влияние шероховатости поверхности на гидродинамику вращающегося дискового электрода, поскольку полимерные покрытия, наносимые на электрод, редко обладают совершенно гладкими поверхностями. В работе [25] исследовано влияние шероховатости поверхности, получающейся при полировке электродов абразивами разных размеров, на сигнал (ток) вращающегося дискового электрода. Авторы [25] не обнаружили какого-либо влияния полировки при размере абразивных частиц 14 мкм или меньше. Это не удивительно, если учесть, что в водном растворе типичные значения толщины неподвижного слоя X_D по порядку величины составляют 10^{-3} см. Как правило, выступы на поверхности меньше, чем X_D , и поверхностная шероховатость, по-видимому, серьезного значения не имеет.

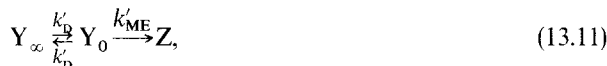
Возможность точного расчета скорости массопереноса субстрата делает метод с использованием вращающегося дискового электрода идеальным для исследования медиаторных реакций в модифицированных электродах, и его используют многие авторы [13, 16, 17, 42, 70, 75]. Предельный ток, определяемый уравнением (13.9), редко наблюдают на модифицированных электродах, поскольку скоростьопределяющей стадией часто является не транспорт субстрата к поверхности электрода, а какой-либо иной процесс. В таких случаях удобнее всего исключать экстраполяцией вклад массопереноса, получая значения эффективной константы скорости k'_{ME} для гетерогенной реакции на электроде. Полученные значения k'_{ME} далее можно анализировать в рамках рассмотренной выше теоретической модели реакций на модифицированных электродах, предложенной Элбери и Хиллманом [3, 4], а также другими авторами [14].

При рассмотрении механизма реакции на модифицированном электроде подвод

субстрата Y из объема раствора можно рассматривать как некоторую дополнительную стадию, характеризуемую константой скорости массопереноса k'_D , где

$$k'_D = D/X_D = 1,554D^{2/3}\nu^{-1/6}W^{1/2}. \quad (13.10)$$

Тогда схему реакции мы можем записать в виде



где Y_∞ – субстрат в объеме раствора и Y_0 – субстрат на поверхности электрода. Схема такого типа была впервые предложена Коутецким и Левичем [54] для описания реакций на вращающихся дисковых электродах. Ее анализ дает следующее выражение для потока j :

$$\frac{1}{j} = \frac{1}{k'_D y_\infty} + \frac{1}{k'_{ME} y_\infty}, \quad (13.12)$$

где y_∞ – объемная концентрация субстрата. Подставляя сюда выражение (13.10) для k'_D и учитывая, что $j = i/nAF$, получаем уравнение Коутецкого–Левича:

$$\frac{1}{i} = \frac{1}{1,554nFAD^{2/3}\nu^{-1/6}W^{1/2}y_\infty} + \frac{1}{nFAk'_{ME}y_\infty}. \quad (13.13)$$

Таким образом, график зависимости i^{-1} от $W^{-1/2}$ должен представлять собой прямую, наклон которой дает величину, обратную величине наклона зависимости, построенной по уравнению Левича, а отрезок, отсекаемый на оси ординат, дает значение k'_{ME} . Эта методика позволяет исключить компоненту, связанную с массопереносом, путем экстраполяции данных на бесконечную скорость вращения, где поверхностная концентрация равна объемной. На основе рассмотренной теории Элбери и Хиллман [3] разработали блок-схему процедуры определения механизма реакции на модифицированном электроде. Авторы обсуждают также случаи, когда график Коутецкого–Левича нелинеен из-за того, что константа k'_{ME} сама зависит от y_0 . В работе [7] этот подход использовали для анализа данных, полученных на электроде с титиновым покрытием.

Теория Коутецкого–Левича применима в большинстве случаев, когда наряду с массопереносом имеется некоторая дополнительная стадия, лимитирующая скорость процесса на вращающемся дисковом электроде. В качестве примера рассмотрим окисление NADH на вращающемся дисковом электроде на основе соли NMP·TCNQ. На рис. 13.15 показаны полученные в этой системе зависимости токов от корня квадратного из скорости вращения (графики Левича) для четырех различных концентраций. Как видно, с увеличением скорости вращения зависимости постепенно выходят на плато, уровень которого зависит от концентрации. Это указывает на наличие некоторой дополнительной скоростьопределяющей стадии. На рис. 13.15, б показаны также соответствующие зависимости Коутецкого–Левича. Наклоны полученных прямых и величины отсекаемых на оси ординат отрезков зависят от концентрации NADH. Как и ожидалось, наклоны этих зависимостей хорошо согласуются со значениями, рассчитанными по уравнению Левича (13.9). По отрезкам, отсекаемым зависимостями Коутецкого–Левича на оси ординат, можно проследить за тем, как скорость поверхностной реакции меняется с концентрацией NADH на поверхности электрода. С помощью этого метода Элбери и Бартлетт [1] показали, что при окислении на NMP·TCNQ-электроде NADH сначала адсорбируется на электроде и затем окисляется до NAD^+ . Аналогичные результаты опубликованы недавно для окисления NADH на модифицированном электроде [37].

Элбери и др. [12] использовали вращающийся дисковый электрод для изучения механизма окисления/восстановления цитохрома *c* из сердца лошади на золотом

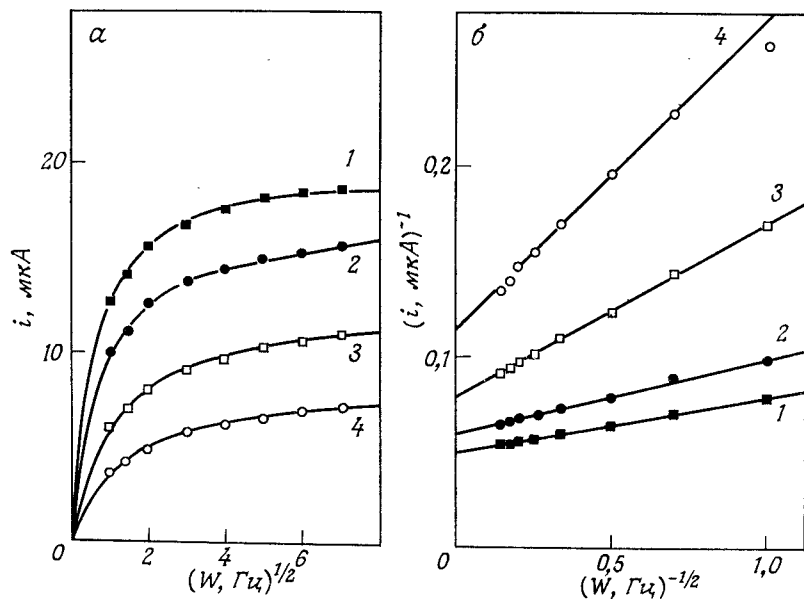


Рис. 13.15. Графики Левича (а) и Коутецкого–Левича (б) для реакции NADH на вращающемся дисковом электроде из NMP·TCNQ при различных концентрациях NADH, ммоль/дм³: 1–0,063; 2–0,13; 3–0,25; 4–0,38. Электролит–0,5 моль/дм³ KCl; 0,1 моль/дм³ Трис-буферный раствор (рН 7,0).

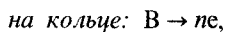
электроде, модифицированном адсорбированным 4,4-дипиридилем. Эта реакция аналогична описанной выше реакции окисления NADH в том, что в обоих направлениях перенос электрона осуществляется через адсорбированный цитохром *c* (гл. 15). Суммарная реакция включает ряд стадий, в том числе массоперенос белка к поверхности электрода, адсорбцию белка на подходящем вакантном центре, перенос электрона, десорбцию продукта и, наконец, массоперенос продукта в объем раствора. Вращающийся дисковый электрод хорошо подходит для изучения реакций этого типа, поскольку с его помощью легко контролировать стадии массопереноса. В работе [12] дан полный анализ зависимости кинетики этого процесса от скорости вращения электрода. Авторы нашли, что в пределах ошибки эксперимента в случае цитохрома *c* константы скоростей адсорбции и десорбции одинаковы. В этих условиях выведенное ими полное выражение для тока электрода упрощается и переходит в уравнение Коутецкого–Левича. По зависимости тока от скорости вращения найдены значения констант скоростей адсорбционной и десорбционной стадий на модифицированном электроде.

Вращающиеся дисковые электроды используют также для изучения переноса различных частиц через мембраны [35, 39–41]. Мембрану прикрепляют к лицевой поверхности вращающегося дискового электрода, так чтобы частицы успевали диффундировать через мембрану, прежде чем они вступят в реакцию на электроде. Эта ситуация идентична рассмотренным выше случаям электрохимических реакций на полимерных модифицированных электродах (случаи Et_L и E_kE на рис. 13.3). В работе [39] проведен анализ массопереноса в таком покрытом мембраной электроде. Полученное авторами выражение идентично уравнению Коутецкого–Левича. Это не удивительно, поскольку мембрана действует просто как дополнительный, не зависящий от

скорости вращения барьер, препятствующий переносу субстрата к электроду (в этих условиях $k_{ME} = kD_y/L$). Эта же методика была использована для измерения коэффициентов диффузии кислорода и гидрохинона в мембранах [41]. Очевидно, однако, что она применима лишь для электроактивных частиц.

13.4.2. Вращающийся дисковый электрод с кольцом

Добавление к вращающемуся дисковому электроду концентрического кольца значительно расширяет возможности метода. Кольцевой электрод располагается по течению потока жидкости от диска, и поэтому его можно использовать для детектирования и количественного определения продуктов реакции, протекающей на диске. Отношение тока i_R , регистрируемого на кольцевом электроде, к току i_D дискового электрода при протекании на последнем реакции с образованием устойчивого продукта называют коэффициентом эффективности N_0 . Таким образом, если на двух электродах имеют место реакции:



то

$$N_0 = -i_R/i_D, \quad (13.14)$$

где [5]

$$N_0 = 1 - F(\alpha/\beta) + \beta^{2/3} [1 - F(\alpha)] - (1 + \alpha + \beta)^{2/3} = \{1 - F[(\alpha/\beta)(1 + \alpha + \beta)]\}, \quad (13.15)$$

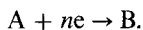
$$F(\theta) = \frac{\sqrt{3}}{4\pi} \ln \left[\frac{(1 + \theta^{1/3})^3}{1 + \theta} \right] + \frac{3}{2\pi} \cdot \operatorname{arctg} \left(\frac{2\theta^{1/3} - 1}{\sqrt{3}} \right) + \frac{1}{4}, \quad (13.16)$$

$$\alpha = (r_2/r_1)^3 - 1, \quad (13.17)$$

$$\beta = (r_3/r_1)^3 - (r_2/r_1)^3, \quad (13.18)$$

r_1 , r_2 и r_3 — радиусы, показанные на рис. 13.16. Существенно, что коэффициент эффективности N_0 зависит только от трех этих радиусов и не зависит от скорости вращения. Значения N_0 для обычных соотношений радиусов табулированы в работе [5].

Кольцо можно использовать также в режиме экранирования, когда и на диске, и на кольце протекает реакция



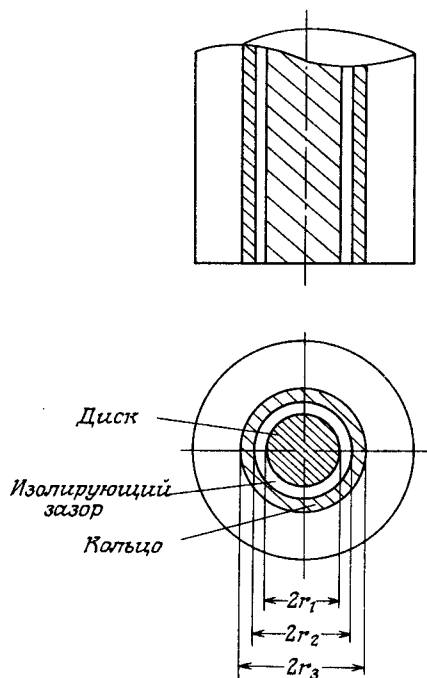
В этих условиях ток кольца меньше его предельного значения (при $i_D = 0$) на расчетную величину, соответствующую доле тока диска [5]:

$$i_{R,L} = i_{R,L}^0 - N_0 i_D, \quad (13.19)$$

где $i_{R,L}$ — наблюдаемый предельный ток кольца и $i_{R,L}^0$ — ток кольца при $i_D = 0$. Эти соотношения легко понять, рассмотрев полярограммы, приведенные на рис. 13.17. Полярограммы для двух случаев — когда ток диска равен нулю и i_D — смещены друг относительно друга (в данном случае предполагается, что это смещение обратимо) на величину $N_0 i_D$.

Большим достоинством вращающегося дискового электрода с кольцом является то, что, зная коэффициент эффективности, по наблюдаемому току кольца можно найти поток на дисковом электроде. Это оказалось особенно удобным при изучении электрохимической полимеризации тионина [13], где только часть тока дискового электрода

Рис. 13.16. Схема дискового электрода с кольцом.



идет на реакцию полимеризации. В описываемом эксперименте количество тионина, расходуемого при полимеризации на дисковом электроде, детектировали кольцевым электродом. Показано, что результаты измерений на дисковом электроде с кольцом хорошо согласуются с данными о заполнении поверхности электрода, полученными методом циклической вольтамперометрии. В работе [20] тот же метод применили для изучения восстановления кислорода на электродах, модифицированных пленкой полимеризованного фталоцианина. Кольцевой электрод использовали для определения доли пероксида водорода, образующегося в результате восстановления кислорода.

Вращающийся дисковый электрод с кольцом успешно применяют также для исследования систем с иммобилизованными ферментами. Авторы [52] использовали

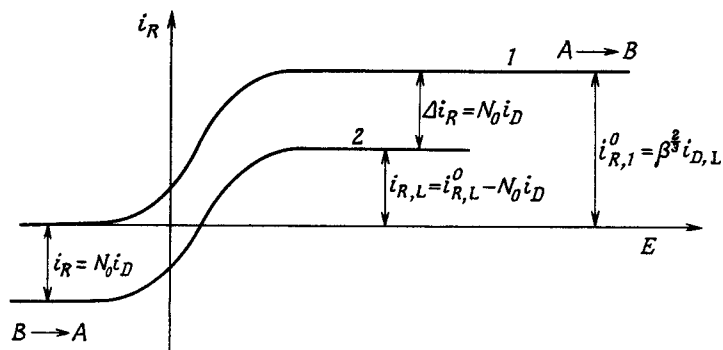


Рис. 13.17. Регистрируемая на кольце полярограмма дискового электрода с кольцом при $i_D = 0$ (1) и $i_D \neq 0$ (2), когда на диске протекает реакция $A + ne \rightarrow B$.

систему, состоящую из платинового кольцевого электрода и диска из платины, окисленного графита или угольной пасты, на котором иммобилизовали глюкозооксидазу. С помощью такого электрода авторы могли измерить потоки H_2O_2 , образующегося на диске при взаимодействии глюкозы и кислорода с иммобилизованным ферментом. Достоинством этой системы является контролируемость и воспроизводимость массопереноса реагирующих веществ к поверхности диска. Таким образом оказалось возможным исследовать влияние иммобилизации на кинетику ферментативной реакции.

Наряду с измерениями в стационарном режиме дисковый электрод с кольцом можно использовать также в варианте релаксационной или переменноточковой вольт-амперометрии. В релаксационных экспериментах кольцевой электрод служит для регистрации изменения во времени потока продукта реакции на диске при заданном изменении тока или потенциала диска. Элбери и др. [11] разработали общий метод расчета исходного потока на диске по наблюдаемому переходному сигналу кольца. Этот метод позволяет выделять отдельные компоненты переходного тока на диске в тех случаях, когда в него вносят вклад два и более процессов. Эта процедура «разложения» на составляющие тривиальна, если характерное время наблюдаемого переходного тока кольца велико по сравнению с временем, затрачиваемым частицами на прохождение зазора между диском и кольцом (величина порядка X_B^2/D). Тогда соотношение стационарных токов диска и кольца с хорошим приближением описывается выражением

$$i_D(t) \simeq -i_R(t) N_O^{-1}. \quad (13.20)$$

Если, однако, временной масштаб для переходного тока кольца сравним с характерным временем перехода частиц через зазор, то приходится прибегать к более сложной процедуре с применением ряда специальных функций и подгонкой их к экспериментальным данным с помощью компьютера.

Для изучения адсорбционных процессов можно использовать вращающийся дисковый электрод с синусоидальной модуляцией. В этом методе гальваностатируемый ток диска модулируют синусоидой малой амплитуды и регистрируют частотные зависимости совпадающих и сдвинутых по фазе компонентов результирующего модулированного тока кольца. Комплексный коэффициент эффективности определяется как

$$N_\omega = -\tilde{i}_R/\tilde{i}_D = X + iY, \quad (13.21)$$

где \tilde{i}_R и \tilde{i}_D — модулированные компоненты кольцевого и дискового тока соответственно. N_ω имеет три составляющие, которые характеризуют транспортные (N_{tr}), емкостные (N_C) и фарадеевские (N_F) свойства системы:

$$N_\omega = (N_{tr}N_F) + N_C. \quad (13.22)$$

Чтобы найти отсюда фарадеевский коэффициент, необходимо скорректировать данные с учетом влияния N_C и N_{tr} . Сделать это легко, поскольку N_{tr} поддается расчету (это проверено на ферри/ферроцианидной системе с платиновым дисковым электродом и платиновым кольцом [8, 10], а N_C можно оценить экстраполяцией экспериментальных данных в область высоких частот, где остальными членами можно пренебречь. Найденный таким способом комплексный фарадеевский коэффициент эффективности можно сравнить с теоретически предсказанным значением. Достоинством этого метода является то, что при соответствующем выборе потенциала кольцевого электрода можно следить либо за реагирующим веществом, либо за продуктом реакции. Следовательно, изучая адсорбцию, оба вещества можно определять независимо. Этот подход использован при изучении адсорбции тионина [4] и метилвиологена [6] на платине, а также реакции цитохрома *c* на модифицированном золотом электроде [12].

Адсорбция 4,4'-дипиридила на золотом электроде существенно усиливает активность цитохрома *c* по сравнению с электродом из чистого золота. Используя переменноточковый вариант в комбинации с вращающимся диском с кольцом, авторы [12] смогли исследовать адсорбцию цитохрома *c* на модифицированном электроде и рассчитать полный профиль свободной энергии для данной реакции.

13.5. Выводы

В этой главе мы проанализировали некоторые потенциальные применения модифицированных электродов в биосенсорах и вообще биохимических и биомедицинских исследованиях. Можно ожидать, что по мере углубления представлений о взаимодействии между биологическими системами и электродами эта весьма перспективная область будет быстро развиваться. Чтобы научиться управлять поведением биологических систем с электродами, мы должны уметь конструировать поверхности электродов. В свою очередь это требует умения моделировать свойства модифицированных электродов и знаний об электрохимических процессах. Надеюсь, что настоящая глава дала представление о путях достижения этой цели и, может быть, побудит некоторых исследователей испытать себя в этой интересной области химии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Albery W. J., Bartlett P. N.* An organic conductor electrode for the oxidation of NADH. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 234–6 (1984).
2. *Albery W. J., Hillman A. R.* Ring-disc electrodes. Part 19. Adsorption studies at low frequency A. C. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **75**, 1623–34 (1979).
3. *Albery W. J., Hillman A. R.* Modified electrodes. *Ann. Rep. Prog. Chem., Sect. C*, 377–437 (1981).
4. *Albery W. J., Hillman A. R.* Transport and kinetics in modified electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **170**, 27–49 (1984).
5. *Albery W. J., Hitchman M. L.* Ring-disc electrodes. Clarendon Press, Oxford, 1971.
6. *Albery W. J., Bartlett P. N., McMahon A. J.* Transport and kinetics at microheterogeneous electrodes. Part 5, the methyl viologen platinum system. *J. Electroanal. Chem.*, **182**, 7–23 (1985).
7. *Albery W. J., Boutelle M. G., Hillman A. R.* The mechanism of Faradaic reactions at the thionine coated electrode. *J. Electroanal. Chem.*, **182**, 99–111 (1985).
8. *Albery W. J., Compton R. G., Hillman A. R.* Ring-disc electrodes. Part 18. Collection efficiency at high frequency A. C. *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, **74**, 1007–19 (1978).
9. *Albery W. J., Jones C. C.* A novel electrode for electrochemical ESR and its application to modified electrodes. *J. Amer. Chem. Soc.*, **106**, 469–73 (1984).
10. *Albery W. J., Drury J. S., Hutchinson A. P.* Ring-disc electrodes. Part 15. Alternating current measurements. *Trans. Faraday Soc.*, **67**, 2414–18 (1971).
11. *Albery W. J., Boutelle M. G., Colby P. J., Hillman A. R.* The kinetics of electron transfer in the thionine coated electrode. *J. Electroanal. Chem.*, **133**, 135–45 (1982).
12. *Albery W. J., Eddowes M. J., Hill H. A. O., Hillman A. R.* Mechanism of the reduction and oxidation reaction cytochrome *c* at a modified gold electrode. *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 3904–10 (1981).
13. *Albery W. J., Foulds A. W., Hall K. J., Hillman A. R.* Thionine coated electrode for photogalvanic cells. *J. Electrochem. Soc.*, **127**, 654–61 (1980).
14. *Andrieux C. P., Dumas-Bouchiat J. M., Saveant J. M.* Catalysis of electrochemical reactions at redox polymer electrodes. Kinetic model for stationary voltammetric techniques. *J. Electroanal. Chem.*, **131**, 1–35 (1982).
15. *Anson F. C.* Kinetic behaviour expected from outer sphere redox catalysts confined within polymeric films on electrode surfaces. *J. Phys. Chem.*, **84**, 3336–8 (1980).
16. *Anson F. C., Oshaka T., Saveant J.-M.* Diffusional pathways for multiply-charged ions incorporated in polyelectrolyte coatings on graphite electrodes. Cobalt oxalate in coatings of protonated polylysine. *J. Phys. Chem.*, **87**, 640–647 (1983).
17. *Anson F. C.* Kinetics of electron transfer cross-reactions within redox polymers. Coatings of a protonated polylysine copolymer with incorporated electroactive anions. *J. Amer. Chem. Soc.*, **105**, 4883–90 (1983).
18. *Aoki K., Tokuda K., Matsuda H.* Theory of linear sweep voltammetry with finite diffusion space. *J. Electroanal. Chem.*, **146**, 417–29 (1983).
19. *Bard A. J., Faulkner L. R.* *Electrochemical methods*. Wiley, New York, 1980.

20. *Behret H., Binder H., Sandstede G., Scherer G.G.* On the mechanism of electrocatalytic oxygen reduction at metal chelates. Part III: metal phthalocyanines. *J. Electroanal. Chem.*, **117**, 29–42 (1981).
- 20a. *Bianco P., Haladjian T.* Electrochemical investigation of cytochrome c_3 from *Desulfovibrio desulfuricans* Norway at solid electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **137**, 367–76 (1982).
21. *Bidan G., Deronzier A., Moutet J.-C.* Electrochemical coating of an electrode by a poly(pyrrole) film containing viologen. *J. C. S. Chem. Commun.*, 1185–6 (1984).
22. *Birke R.L.* Current-potential-time relationships in differential pulse polarography: theory of reversible, quasi-reversible, and irreversible electrode processes. *Anal. Chem.*, **50**, 1489–96 (1978).
23. *Bolts J.M., Wrighton M.S.* Chemically derivatised *n*-type, semiconducting gallium arsenide photoelectrodes. Thermodynamically uphill oxidation of surface-attached ferrocene centres. *J. Amer. Chem. Soc.*, **101**, 6179–84 (1979).
24. *Brown A.P., Anson F.C.* Cyclic and differential pulse voltammetric behaviour of reactants confined to the electrode surface. *Anal. Chem.*, **49**, 1589–95 (1977).
25. *Bruckenstein S., Sharkey J.W., Yip J.Y.* Effect of polishing with different size abrasives on the current response at a rotating disc electrode. *Anal. Chem.*, **51**, 368–71 (1985).
26. *Bull R.A., Fan F.-R., Bard A.J.* Polymer films on electrodes. 13. Incorporation of catalysts into electrochemically conductive polymers – iron phthalocyanine in polypyrrole. *J. Electrochem. Soc.*, **130**, 1636–8 (1983).
27. *Burgmayer P., Murray R.W.* An ion gate membrane: electrochemical control of ion permeability through a membrane with an embedded electrode. *J. Amer. Chem. Soc.*, **104**, 6139–40 (1982).
28. *Burgmayer P.* Ion gate electrodes. Polypyrrole as a switchable ion conductor membrane. *J. Phys. Chem.*, **88**, 2515–21 (1984).
29. *Cochran W.G.* The flow due to a rotating disc. *Proc. Camb. Phil. Soc. Math. Phys. Sci.*, **30**, 365–75 (1934).
30. *Daum P., Lehnard J.R., Rolison D.R., Murray R.W.* Diffusion charge transport through ultrathin films of radiofrequency plasma polymerised vinylferrocene at low temperature. *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 4649–53 (1980).
31. *Degrad C., Miller L.L.* An electrode modified with polymer-bound dopamine which catalyses NADH oxidation. *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 5728–32 (1980).
32. *Diaz A.F., Kanazawa K.K.* Electrochemical polymerisation of pyrrole. *J. C. S. Chem. Commun.*, 635–6 (1979).
33. *Elving P.J., Schmackel C.O., Santhanam K.S.V.* Nicotinamide-NAD sequence: redox processes and related behaviour: behaviour and properties of intermediates and final products. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **6**, 1–67 (1976).
34. *Faulkner L.R.* Chemical microstructures on electrodes. *Chem. and Eng. News*, Feb. 27th, 28–45 (1984).
35. *Freese J.W., Smart R.B.* Rotating voltammetric membrane electrode. *Anal. Chem.*, **54**, 836–7 (1982).
36. *Ghosh P.K., Spiro T.G.* Electroactive coatings of tris(bipy)- and tris(*o*-phen) ruthenium (II) attached to electrodes via hydrosilylation and electropolymerisation of vinyl derivatives. *J. Electrochem. Soc.*, **128**, 1281–7 (1981).
37. *Gorton L., Torstensson A., Jaegfeldt H., Johansson G.* Electrocatalytic oxidation of reduced nicotinamide coenzymes by graphite electrodes modified with an adsorbed phenoxazinium salt, Meldola blue. *J. Electroanal. Chem.*, **161**, 103–20 (1984).
38. *Gorton L., Johansson G., Totstenson A.J.* *Electroanal. Chem.*, **196**, 81–92 (1985).
39. *Gough D.A., Leyboldt J.K.* Membrane covered rotated disc electrode. *Anal. Chem.*, **51**, 439–44 (1979).
40. *Gough D.A.* Transient studies of glucose oxygen and hydroquinone at a membrane covered rotated disc electrode. *J. Electrochem. Soc.* **127**, 1278–86 (1980).
41. *Gough D.A.* Rotated membrane-coated oxygen electrode. *Anal. Chem.*, **52**, 1126–30 (1980).
42. *Haas O., Zumbunnen H.-R.* Electrochemical properties of hydroxyphenazine coated electrodes. *Helv. Chim. Acta*, **64**, 854–63 (1981).
43. *Heinze J.* Cyclic voltammetry – electrochemical spectroscopy. *Angew. Chem., Int. Edn. Engl.*, **23**, 831–918 (1984).
44. *Ianniello R.M., Lindsay T.J., Yacynych A.M.* Direct electron transfer in immobilised flavoenzyme chemically modified graphite electrodes. *Anal. Chim. Acta*, **141**, 23–32 (1982).
45. *Ianniello R.M.* Differential pulse voltammetric study of direct electron transfer in glucose oxidase chemically modified graphite electrodes. *Anal. Chem.*, **54**, 1098–101 (1982).
46. *Ikeda T., Ando S., Senda M.* Electrochemical oxidation-reduction properties of covalently bound FAD of cholesterol oxidase adsorbed on a mercury electrode surface. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 2189–93 (1981).
47. *Ikeda T., Toriyama K., Senda M.* Electrochemical behaviour of ferredoxins adsorbed on mercury electrode surface. Cyclic D. C. and A. C. voltammetric studies with HMDE. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 1937–43 (1979).
48. *Jaegfeldt H., Torstensson A., Gorton L., Johansson G.* Catalytic oxidation of reduced nicotinamide

- adenine dinucleotide by graphite electrodes modified with adsorbed aromatics containing catechol functionalities. *Anal. Chem.*, **53**, 1979–82 (1981).
49. Kakutani T., Senda M. Theory of A.C. polarisation and A.C. polarography and voltammetry of surface redox reaction. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **52**, 3236–41 (1979).
 50. Kakutani T., Kano K., Ando S., Senda M. Electrochemical oxidation and reduction of FMN adsorbed on a mercury electrode surface. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **54**, 884–90 (1981).
 51. Kakutani T., Toriyama K., Ikeda T., Senda M. Electrochemical oxidation and reduction of ferredoxin adsorbed on a mercury electrode surface. Phase-selective A.C. polarography at DME. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **53**, 947–50 (1980).
 52. Kamin R.A., Wilson G.S. Rotating ring-disc enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterisation of the immobilised enzyme layer. *Anal. Chem.*, **52**, 1198–205 (1980).
 53. Kitani A., So Y.-H., Miller L.L. An electrochemical study of the kinetics of NADH being oxidised by diimines derived from diaminobenzenes and diaminopyrimidines. *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 7636–41 (1981).
 54. Коутецкий Я., Левич В.Г. Применение вращающегося дискового электрода к изучению кинетических и каталитических процессов в электрохимии. *Журн. физич. химии*. 1958. Т. 32. С. 1565–75.
 55. Lane R.F., Hubbard A.T. Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents. *J. Phys. Chem.*, **77**, 1401–10 (1973).
 56. Lane R.F. Electrochemistry of chemisorbed molecules. II. The influence of charged chemisorbed molecules on the electrode reactions of platinum complexes. *J. Phys. Chem.*, **77**, 1411–21 (1973).
 57. Lau A.N., Miller L.L. Electrochemical behaviour of a dopamine polymer. Dopamine release as a primary analog of a synapse. *J. Amer. Chem. Soc.*, **105**, 5271–7 (1983).
 58. Lau A.N., Zinger B. Release of neurotransmitters glutamate and γ -aminobutyric acid from an electrode. Catalysis of slow redox propagation through a polymer film. *J. Amer. Chem. Soc.*, **105**, 5278–84 (1983).
 59. Laviron E. Use of linear potential sweep voltammetry and A.C. voltammetry for the study of the surface electrochemical reaction of strongly adsorbed systems and of redox modified electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **100**, 263–70 (1979).
 60. Laviron E. A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes. Part I. Description and discussion of the model. *J. Electroanal. Chem.*, **112**, 1–9 (1980).
 61. Laviron E. A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes. Part III: influence of interactions between the electroactive centres in the first layer on the linear potential sweep voltammograms. *J. Electroanal. Chem.*, **122**, 37–44 (1981).
 62. Laviron E., Roullier L. General expression of the linear potential sweep voltammogram for a surface redox reaction with interactions between adsorbed molecules – applications to modified electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **115**, 65–74 (1980).
 63. Laviron E., Degrand C. A multilayer model for the study of space distributed redox modified electrodes. Part II. Theory and application of linear potential sweep voltammetry for a simple reaction. *J. Electroanal. Chem.*, **112**, 11–23 (1980).
 64. Lin A.W.C., Yeh P., Yacynych A.M., Kuwana T. Cyanuric chloride as a general linking agent for attachment of redox groups to pyrolytic graphite and metal oxide electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **84**, 411–19 (1977).
 65. Moses P.R., Weir L., Murray R.W. Chemically modified tin oxide electrodes. *Anal. Chem.*, **47**, 1882–6 (1975).
 66. Murray R.W. Chemically modified electrodes. In *Electroanalytical chemistry* (ed. A.J. Bard), vol. 13, pp. 191–38. Marcel Dekker, New York, 1984.
 67. Oglesby D.M., Omang S.H., Reitley C.N. Thin layer electrochemical studies using controlled potential or controlled current. *Anal. Chem.*, **37**, 1312–6 (1965).
 68. Osteryoung J. Pulse polarography. In *Water quality measurement* (eds. H.B. Mark, J.S. Mattson), pp. 85–190. Marcel Dekker, New York, 1981.
 69. Oyama N., Anson F.C. Factors affecting the electrochemical response of metal complexes at pyrolytic graphite electrodes coated with films of poly(4-vinylpyridine). *J. Electrochem. Soc.*, **127**, 640–7 (1980).
 70. Oyama N. Catalysis of electrode processes by multiply-charged metal complexes electrostatically bound to polyelectrolyte coatings on graphite electrodes, and the use of polymer coated rotating disc electrodes in diagnosing kinetic and conduction mechanisms. *Anal. Chem.*, **52**, 1192–8 (1980).
 71. Oyama N., Oshaka T., Ushirogouchi T. Charge-transfer reactions of metal complexes at electrode/film interfaces and in films. *J. Phys. Chem.*, **88**, 5274–80 (1984).
 72. Oyama N., Kaneko M., Sato K., Matsuda H. Electrode kinetics of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ and $\text{Fe}(\text{CN})_5^{2-/3-}$ complexes confined to polymer films on graphite surfaces. *J. Amer. Chem. Soc.*, **105**, 6003–8 (1983).
 73. Pearce P.J., Bard A.J. Polymer films on electrodes. Part II: film structure and mechanism of electron transfer with electrodeposited poly(vinyl-ferrocene). *J. Electroanal. Chem.*, **112**, 97–115 (1980).

74. *Robinson J.* Spectroelectrochemistry. In Specialist periodical reports, electrochemistry, vol. 9, pp. 101–61. Royal Society of Chemistry, London, 1984.
75. *Rocklin R. D., Murray R. W.* Kinetics of electrocatalysis of dibromoalkyl reductions using electrodes with covalently immobilised metallo-tetraphenyl-porphyrins. *J. Phys. Chem.*, **85**, 2104–12 (1981).
76. *Thackeray J. W., White H. S., Wrighton M. S.* Poly(3-methylthiophene)-coated electrodes: optical and electrical properties as a function of redox potential and amplification of electrical and chemical signals using poly(3-methylthiophene)-based microelectronic transistors. *J. Phys. Chem.*, **89**, 5133–49 (1985).
77. *Torstensson A., Gorton L.* Catalytic oxidation of NADH by surface-modified graphite electrodes. *J. Electroanal. Chem.*, **130**, 199–207 (1981).
78. *Tse D. C. S., Kuwana T.* Electrocatalysis of dihydronicotinamide adenosine diphosphate with quinones and modified quinone electrodes. *Anal. Chem.*, **50**, 1315–18 (1978).
79. *Von Karman T.* Über laminare und turbulente Reibung. *Z. Angew. Math. Mech.*, **1**, 233–52 (1921).
80. *Zinger B., Miller L. L.* Timed release of chemicals from polypyrrole films. *J. Amer. Chem. Soc.*, **106**, 6861–3 (1984).

Глава 14

Изучение ферментативных реакций, используемых в медиаторных биосенсорах, методом циклической вольтамперометрии

Грэм Дэвис

14.1. Введение

Во многих биосенсорах в качестве катализатора окисления субстрата применяют оксидазу [6]. До сих пор попытки подвергнуть образующийся комплекс восстановленного фермента с кофактором быстрому прямому электрохимическому реокислению были фактически безуспешными; поэтому для переноса электрона с каталитического центра на электрод необходимы акцепторы электронов. Чаще всего используют кислород, поскольку он является природным акцептором электрона для многих ферментов и обычно присутствует в анализируемом растворе (гл. 1 и 18).

В последнее время предпринимаются попытки заменить кислород нефизиологическими акцепторами электрона (медиаторами), иммобилизованными на поверхности электрода или в ферментном слое (гл. 15 и 16). В пользу этого подхода говорят результаты исследований электродов с покрытием из редокс-частиц, удерживаемых благодаря адсорбции, образованию полимерного слоя или ковалентному присоединению ([3, 22], гл. 13). Применительно к амперометрическим биосенсорам это сулит некоторые преимущества. Например, при использовании медиатора с низким окислительно-восстановительным потенциалом электрод может функционировать при более низком потенциале, чем требуется для определения пероксида водорода [7]. Таким путем можно уменьшить мешающее влияние посторонних электроактивных частиц, обычно присутствующих в биологических препаратах. Стабильность работы биосенсора можно также повысить, поддерживая постоянной концентрацию акцептора электронов, удерживаемого в ферментном слое. Тем самым устраняется проблема, характерная для кислород-зависимых биосенсоров, у которых колебания давления кислорода влияют на сигнал электрода. Таким образом, амперометрические биосенсоры с иммобилизованными медиаторами вполне могут конкурировать с системами, детектирующими H_2O_2 [24, 26, 27].

При выборе подходящего медиатора для амперометрического биосенсора весьма полезным может оказаться метод постоянноточковой циклической вольтамперометрии. Этот метод позволяет установить многие важные свойства медиатора. Обычно желательно, чтобы медиатор имел низкий окислительно-восстановительный потенциал и высокую константу скорости электрохимической реакции. Последнее условие связано с тем, что сигнал биосенсора не должен лимитироваться кинетикой электродных процессов. Оба параметра можно определять с помощью одноимпульсной циклической вольтамперометрии. По изменению формы вольтамперных кривых во времени можно оценивать также стабильность медиатора в зависимости от pH, давления кислорода, присутствия ингибиторов и мешающих примесей. Еще более важно, что метод дает качественную и количественную информацию об электрохимически сопряженных ферментативных реакциях, на которых основано функционирование медиаторных амперометрических биосенсоров.

14.2. Постоянноточковая циклическая вольтамперометрия

Постоянноточковая циклическая вольтамперометрия основана на поддержании на рабочем электроде заданного потенциала, измеряемого относительно электрода сравнения и устанавливаемого пропусканием тока между рабочим и вспомогательным электродом [4]. Для реализации метода требуется потенциостат с генератором импульсов треугольной формы и двухкоординатный осциллограф или самописец для регистрации вольтамперных кривых. В опытах обычно используют ячейку, содержащую рабочий электрод (изготавливаемый из золота, платины или угля) диаметром 2–4 мм, противоэлектрод в виде платиновой сетки и насыщенный каломельный электрод (н.к.э.) в качестве электрода сравнения [11]. Так как скорость ферментативных реакций зависит от температуры, эксперимент лучше всего проводить в термостатируемых условиях.

В циклической вольтамперометрии на неподвижный электрод в перемешиваемом растворе налагают развертку потенциала, характеризуемую постоянной скоростью и некоторыми пределами, и регистрируют ток как функцию потенциала (рис. 14.1). Работу можно вести как в одноимпульсном режиме, когда развертку потенциала проводят однократно, так и в непрерывном циклическом режиме.

Измеряемый ток имеет две компоненты: нефарадеевскую, обусловленную перераспределением заряженных и полярных частиц на поверхности электрода, и фарадеевскую, связанную с обменом электронов между электродом и частицами в растворе. Когда скорость переноса электрона (при потенциалах, достаточных для окисления или восстановления) велика, фарадеевский ток лимитируется скоростью диффузии частиц к электроду. Отсюда, при обратимом восстановлении редокс-частиц O по реакции



поверхностная концентрация обеих форм – окисленной и восстановительной – определяется уравнением Нернста:

$$[O]/[R] = \exp [nF/RT(E - E^0)], \quad (14.2)$$

а фарадеевский ток зависит от концентрационного градиента формы O на поверхности

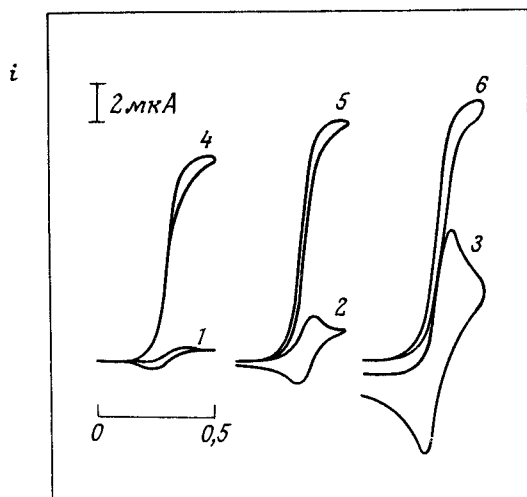
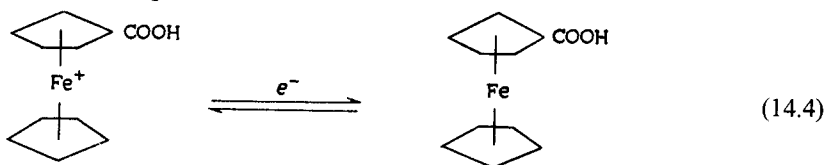


Рис. 14.1. Циклические вольтамперограммы, полученные на золотом электроде диаметром 4 мм в 50 мМ фосфат-перхлоратном электролите (рН 7,0), содержащем 200 мкМ ферроцен-монокарбоновой кислоты (1–3) и при добавлении 11 мкМ глюкозооксидазы и 50 мМ глюкозы (4–6); электрод сравнения – н.к.э., скорость развертки 1 (1, 4), 10 (2, 5) и 100 мВ·с⁻¹ (3, 6).

электрода:

$$i_f = nFAD_0(d[O]/dx)_{x=0}. \quad (14.3)$$

При регистрации циклической вольтамперограммы рабочий электрод выдерживают при положительном потенциале и затем проводят развертку в направлении E^0 для редокс-частиц, проходя несколько дальше E^0 . По мере восстановления электролит вблизи электрода обедняется веществом O , соответственно и ток не остается на постоянном уровне, он проходит через пик и затем падает. При обращении направления развертки потенциала наблюдается пик, обуславливаемый реокислением R . Пример окислительно-восстановительной реакции, следующей уравнению (14.2) – такие реакции называются нернстовскими, или обратимыми, – показан на рис. 14.1 (кривые 1–3). Это серия вольтамперных кривых для пары типа ферроцен/ион ферроцена при разных скоростях развертки v . Данная редокс-пара образуется в растворе ферроцен-монокарбоновой кислоты по реакции



Для обратимой реакции этого типа максимальный катодный ток определяется выражением

$$i_p = 0,4463nFA(D_0nFv/RT)^{1/2}C_0. \quad (14.5)$$

При этом регистрируемый пик смещен от E^0 на $28,5/n$ мВ в сторону отрицательных потенциалов, независимо от скорости развертки.

Экспериментально E^0 можно оценить как среднее ($E_{1/2}$) из потенциалов максимумов анодного и катодного тока. Если медиатор химически неустойчив и превращается в соединение с другими окислительно-восстановительными свойствами, со временем амплитуда пика уменьшается.

14.3. Электрохимически сопряженные ферментативные реакции

Для быстрой реакции между комплексом оксидоредуктазы типа восстановленный фермент – кофактор (Z) и акцептором электронов необходимо, чтобы и стехиометрия, и относительные редокс-потенциалы благоприятствовали переносу электрона [19]. Кроме того, активный центр фермента должен быть доступен для молекулы акцептора.

Упрощенно рассматриваемую реакцию можно представить в следующем виде:



Компонент Z служит для превращения O обратно в R при потенциалах, при которых O генерируется на электроде. Качественно на вольтамперограмме протекание реакции отражается в увеличении анодного тока и уменьшении катодного. Теория, предложенная Николсоном и Шэйном [23], показывает, что возможны два предельных случая. Если константа скорости реакции псевдопервого порядка k_f мала, то вольтамперограммы выглядят почти так же, как при обратимом переносе электрона, тогда как при больших значениях k_f ток пропорционален $k_f^{1/2}$ и не зависит от скорости развертки потенциала:

$$i = nFA(D_0k_f)^{1/2}C_0/1 + \exp[nF/RT(E - E_{1/2})]. \quad (14.7)$$

В последнем случае вместо пика наблюдается кривая с насыщением. На рис. 14.1 (кривые 4–6) показаны примеры вольтамперограмм реакции медиатора в присутствии глюкозооксидазы и ее субстрата. Чтобы подтвердить протекание сопряженной каталитической реакции типа (14.6), целесообразно воспользоваться графиком зависимости тока, определяемой уравнением (14.5), от скорости развертки потенциала. Это позволяет оценить порознь влияние скорости развертки на диффузионные и кинетические процессы. Кривая 1 на рис. 14.2 показывает, что в случае обратимой реакции, для которой отношение $i_p/v^{1/2}$ постоянно, получается горизонтальная прямая. Кривая 2 для каталитической реакции приближается к кривой 1 лишь при достаточно высоких скоростях развертки, при которых реакция не протекает в сколько-нибудь заметной степени до завершения эксперимента. На практике рассматриваемую корреляцию можно получить, просто строя зависимость величины $i_p/v^{1/2}$, аппроксимирующей токовую функцию, от $\lg v$. Этот качественный аспект метода весьма важен для разработки биосенсоров, так как обычно достаточно показать возможность определения того или иного вещества, используя исследуемую каталитическую реакцию.

Для получения информации о кинетике реакции необходимо, чтобы электрохимические реакции медиатора были обратимы и чтобы фермент был насыщен субстратом, т.е. $[S] \gg K_M$ [11]. Одним из способов получения требуемой информации – построение приведенного на рис. 14.3 рабочего графика зависимости отношения кинетического и диффузионно контролируемых токов, i_k/i_d , как функции кинетического параметра $(k_f/a)^{1/2}$, где $a = nFv/RT$ [23]. Данные для построения графика получают из вольтамперных кривых, аналогичных приведенным на рис. 14.1. Измеряя i_k/i_d при различных скоростях развертки, при фиксированной концентрации фермента можно получить ряд значений k_f/a . Далее, построив график зависимости k_f/a от $1/v$, можно исключить влияние скорости развертки. Для реакции псевдопервого порядка наклон начального участка этой зависимости равен $k_f RT/nF$, откуда можно рассчитать константу скорости реакции псевдопервого порядка, не зависящую от скорости развертки. Для оценки константы скорости реакции второго порядка $k_s = k_f/[Z]$ для гомогенной реакции между окисленным медиатором и восстановленным кофактор-ферментным комплексом (уравнение (14.6)) проводят опыты при различных концентрациях фермента.

Важно отметить, что до сих пор мы предполагали равенство коэффициентов

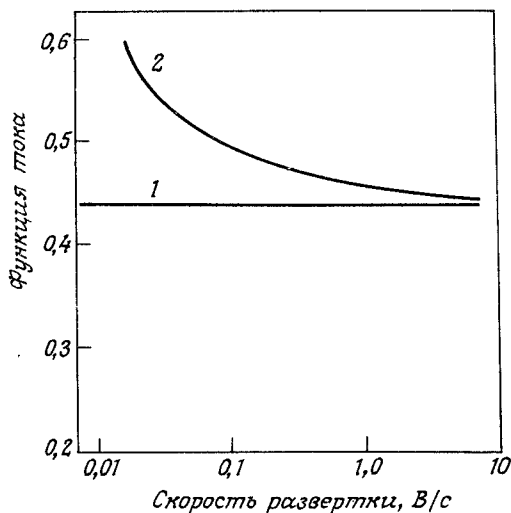
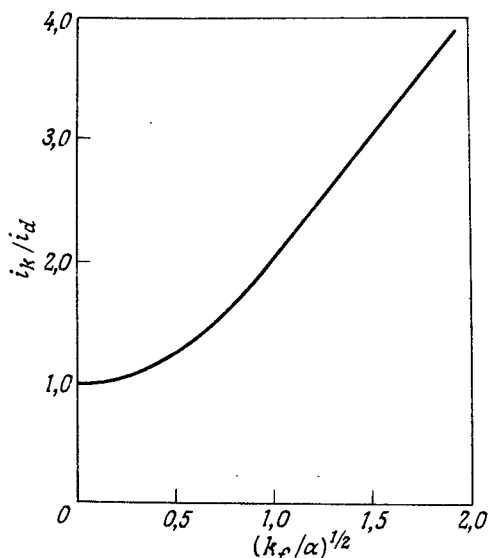


Рис. 14.2. Изменение функции пикового тока $i_p/v^{1/2}$ в зависимости от скорости развертки потенциала для диффузионно контролируемой электрохимической реакции (1) и для каталитической сопряженной реакции типа (14.6) (2).

Рис. 14.3. Теоретическая зависимость отношения токов пика для случаев кинетического и диффузионного контроля, i_k/i_d , от кинетического параметра $(k_f/a)^{1/2}$.



диффузии компонентов O и Z. Это, очевидно, неверно для реакций белков с медиаторами, молекулы которых малы. Райэн и Уилсон [25] показали, что если реакция является очень быстрой (т.е. ее константа скорости больше 10^6 л·моль⁻¹·с⁻¹), то значение константы скорости может быть завышено. Тем не менее данный метод остается полезной альтернативой методу остановленного потока, используемому для исследования кинетики подобных реакций [21, 28].

С помощью циклической вольтамперометрии изучено множество оксидоредуктаз (табл. 14.1). В качестве медиатора использовали ион ферроцена, образующийся

Таблица 14.1. Определенные электрохимически константы скорости реакций восстановленных форм различных ферментов с ферроцений-ионом ферроценмонокарбоновой кислоты при pH 7,0 и 298 К

Фермент	Субстрат	$k \cdot 10^{-5}$, л·моль ⁻¹ ·с ⁻¹
Глюкозодегидрогеназа	Глюкоза	93,0
Флавоцитохром b_2	Лактат	67,0
Галактозооксидаза	Галактоза	8,5 ^a
Ксантинооксидаза	Ксантин	4,0
СО-оксидоредуктаза	Оксид углерода	4,0
Глутатионредуктаза	NADPH	2,0
Глюкозооксидаза	Глюкоза	2,0
Гликолятоксидаза	Гликолят	1,2 ^b
Алкогольдегидрогеназа	Метанол	0,6 ^a
L-Аминокислотная оксидаза	Лейцин	0,4 ^r
Пируватоксидаза	Пируват	0,2
Липоамиддегидрогеназа	NADH	0,2
Саркозиноксидаза	Саркозин	0,1
Холестериноксидаза	Холестерин	—
Оксалатоксидаза	Оксалат	— ^d
Холиноксидаза	Холин	—

^a pH 9,0; ^b pH 8,3; ^c pH 10,5; ^r pH 7,8, 310 К; ^d pH 3,0

в растворе ферроценкарбоновой кислоты. В случае кислород-специфичных ферментов холестериноксидазы, оксалатоксидазы и холиноксидазы не наблюдалось каталитической реакции. Для остальных ферментов, приведенных в табл. 14.1, оценены соответствующие константы скорости [2, 7–9, 12, 14].

Значения констант скорости реакции с ферроценом для кислород-неспецифичных флавоферментов лежат в диапазоне $10^4 - 10^6 \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$, т. е. в том же диапазоне, что и для реакции с кислородом [5, 16]. Отсюда авторы работы [5] сделали вывод, что каталитическая активность этих ферментов связана с окислением субстрата, а не последующим реокислением флавиновой группировки. Из сравнения этих данных следует, что использование нефизиологического акцептора с кислород-неспецифичными флавопротеинами не приводит непременно к каким-либо осложнениям. Однако на практике в биосенсорах, основанных на реакции этого типа, важно свести к минимуму побочную реакционную способность фермента по отношению к кислороду.

На сегодняшний день лучше других изучен фермент глюкозооксидаза, для которой определены температурные и pH-зависимости констант скоростей реакции с различными производными ферроцена (табл. 14.2). Интересно, что, хотя во всех случаях эта

Таблица 14.2. Определенные электрохимически константы скорости реакции восстановленной глюкозооксидазы с ферроцений-ионом для ряда производных ферроцена при pH 7,0 и 298 K

Производное ферроцена	$E_{1/2}$, мВ (отн. н.к.э.)	$k_s \cdot 10^{-5}$, л·моль ⁻¹ ·с ⁻¹
1,1'-Диметилферроцен	100	0,8
Ферроцен	165	0,3
Винилферроцен	250	0,3
Ферроценмонокарбоновая кислота	275	2,0
1,1'-Ферроцендикарбоновая кислота	285	0,3
Метилтриметиламиноферроцен	400	5,3
Поливинилферроцен	450	—

каталитическая реакция термодинамически выгодна, на электроде, покрытом поливинилферроценом по методике [20], ее не удалось обнаружить. Это может быть обусловлено неспособностью связанного с полимером ферроцена проникать подобно мономеру в активный центр фермента и тем самым обеспечивать быстрый перенос электрона.

Помимо изучения реакций между оксидоредуктазами и нефизиологическими редокс-частицами циклическую вольтамперометрию используют для исследования *in vitro* окислительно-восстановительных реакций между белками. На золотом электроде, модифицированном дипиридилем, электрохимическая реакция цитохрома *c* из сердца лошади обратима [15]. На основании этого Хилл и Уолтон [18] показали, что цитохромоксидаза приобретает электроны за счет восстановления кислорода до воды. Скорость этой реакции возрастает в присутствии второго медиаторного редокс-белка, азурина или цитохрома c_{551} (табл. 14.3). Эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными методом остановленной струи [21]. В табл. 14.3 приведены также константы скорости реакции цитохрома *c* с СО-оксидоредуктазой [2] и лактатдегидрогеназой, флавоцитохромом b_2 [8].

Циклическую вольтамперометрию применяют и для качественного изучения сопряженных реакций с участием нескольких ферментов. Например, окисление лактата NAD-зависимой лактатдегидрогеназой может быть сопряжено электрохимически через систему липоамиддегидрогеназа – ферроцен, а для детектирования изоцитрата можно

Таблица 14.3. Определенные электрохимически константы скорости реакций с цитохромом *c* из сердца лошади при pH 7,0 и 293 К

Редокс-белок	$k_s \cdot 10^{-5}, \text{ л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$
Азурин	0,1
Цитохром c_{551}	0,2
СО-оксидоредуктаза	0,3
Флавоцитохром b_2	50

использовать NADH-зависимую изоцитратдегидрогеназу, сопряженную с системой глутатионредуктаза – ферроцен [7] (табл. 14.1).

14.4. Амперометрические биосенсоры

Все рассмотренные выше электрохимически сопряженные ферментативные реакции могут быть использованы для разработки медиаторных амперометрических биосенсоров. Кроме того, изучение такого переносчика электронов, как белок цитохром *c*, показывает, что нет необходимости ограничивать круг медиаторов синтетическими редокс-соединениями.

Практическая ценность постояннотоковой циклической вольтамперометрии при выборе подходящего медиатора для амперометрического биосенсора продемонстрирована в работе Касса и др. [9]. Исходя из представленных в табл. 14.2 данных, для глюкозного сенсора, предназначенного для анализа цельной крови, выбран 1,1-диметилферроцен. Чтобы свести к минимуму побочную реакцию глюкозооксидазы с кислотом, в биосенсор ввели значительный избыток ферроцена. В таких системах важно, чтобы медиатор имел низкую растворимость в водном растворе. Это ограничивает круг используемых конструкций лишь сенсорами на основе пористых углеродных материалов. Кроме того, окислительно-восстановительный потенциал медиатора должен быть настолько низким, чтобы при рабочем потенциале сенсора не мешали мочева кислота и другие электроактивные компоненты цельной крови. В этом отношении производные ферроцена особенно удобны, так как их растворимость и окислительно-восстановительные потенциалы можно контролировать введением различных заместителей в пентадиениловые кольца [13, 19].

Помимо анализа крови больных диабетом глюкозный биосенсор можно использовать для определения скорости реакций в растворе, например для оценки активности креатинкиназы [17]. Разработаны и другие амперометрические биосенсоры, где ферроцен используется в качестве медиатора. В частности, на основе реакций, приведенных в табл. 14.1, созданы сенсоры спиртов [1], оксида углерода [2], гликолята, L-аминокислот и галактозы [14].

ЛИТЕРАТУРА

1. Aston W.J., Ashby R.E., Scott L.D.L., Turner A.P.F. Enzyme based methanol sensor. In Change and field effects in biosystems (eds. M.J. Allen, P.N.R. Usherwood), pp. 491–8. Abacus Pres, Turnbridge, 1984.
2. Aston W.J., Bell J., Colby J., Davis G., Higgins I.J., Hill H.A.O., Turner A.P.F. CO: Acceptor oxidoreductase from *Pseudomonas thermocarboxydovorans* strain C2 and its use in a carbon monoxide sensor. Anal. Chim. Acta, **163**, 161–74 (1984).
3. Bard A.J. Chemical modification of electrodes. J. Chem. Ed., **60**, 302–4 (1983).
4. Bard A.J., Faulkner L.R. Electrochemical methods: fundamentals and applications. John Wiley, New York, 1980.

5. *Bright W.H., Porter D.J.T.* Flavoprotein oxidases. In *The enzymes* (ed. P.D. Boyer), vol. 12B, pp. 421–505. Academic Press, New York, 1975.
6. *Carr P.W., Bowers L.D.* Immobilized enzymes in analytical and clinical chemistry. John Wiley, New York, 1980.
7. *Cass A.E.G., Davis G., Green M.J., Hill H.A.O.* Ferrocene monocarboxylic acid as an electron acceptor for oxidoreductases. *J. Electroanal. Chem.*, **190**, 117–27 (1985).
8. *Cass A.E.G., Hill H.A.O., Nancarrow D.J.* Reaction of flavocytochrome *b*₂ with cytochrome *c* and ferrocene monocarboxylic acid: Comparative kinetics by cyclic voltammetry and chronoamperometry. *Biochim. Biophys. Acta*, **828**, 51–7 (1985).
9. *Cass A.E.G., Francis G., Hill H.A.O., Higgins I.J., Aston W.J., Plotkin E.V., Scott L.D.L., Turner A.P.F.* Ferrocene mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.*, **56**, 667–71 (1984).
10. *Davis G.* Studies in applied bioelectrochemistry. D. Phil. Thesis, University of Oxford, 1984.
11. *Davis G., Aston W.J., Higgins I.J., Hill H.A.O., Turner A.P.F.* Bioelectrochemical fuel cell and sensor based on quinoprotein, alcohol dehydrogenase. *Enzyme Microb. Tech.*, **5**, 383–8 (1983).
12. *D'Costa E.J., Higgins I.J., Turner A.P.F.* Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor. *Biosensors*, **2**, 71–87 (1986).
13. *Deeming A.J.* Mononuclear iron compounds with hydrocarbon ligands. In *Comprehensive organometallic chemistry* (eds. G. Wilkinson, F.G.A. Stone, E.W. Abel), vol. 4, pp. 377–512. Pergamon, Oxford, 1982.
14. *Dicks J., Aston W.J., Davis G., Turner A.P.F.* Mediated amperometric biosensors for D-galactose, glycolate, and L-amino acids based on a ferrocene-modified carbon electrode. *Anal. Chim. Acta*, **182**, 103–12 (1986).
15. *Eddowes M.J., Albery W.J., Hill H.A.O., Hillman A.R.* Mechanism of the reduction and oxidation reaction of cytochromes at a modified gold electrode. *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 3904–10 (1981).
16. *Gibson Q.H., Hastings J.W.* The oxidation of reduced flavin mononucleotide by molecular oxygen. *Biochem. J.*, **83**, 368–77 (1962).
17. *Green M.J., Davis G., Hill H.A.O.* Creatine kinase assay using an enzyme electrode. *J. Biomed. Eng.*, **6**, 176–7 (1984).
18. *Hill H.A.O., Walton N.J.* Investigation of some intermolecular electron transfer reactions of cytochrome *c* by electrochemical methods. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6515–19 (1982).
19. *Kuwana T., Szentrimay R., Yeh R.* Evaluation of mediator titrants for indirect coulometric titrations of biocomponents. *Am. Chem. Soc. Symp. Ser.*, **38**, 143–58 (1977).
20. *Merz A., Bard A.J.* A stable surface modified platinum electrode prepared by coating with electroactive polymer. *J. Am. Chem. Soc.*, **100**, 3222–3 (1978).
21. *Morton R.A., Overnell J., Harbury H.A.* Electron transfer between cytochromes *c* from horse and pseudomonas. *J. Biol. Chem.*, **245**, 4653–7 (1970).
22. *Murray R.W.* Chemically modified electrodes. *Acc. Chem. Res.*, **13**, 135–41 (1980).
23. *Nicholson R.S., Shain I.* Theory of stationary electrode polarography. *Anal. Chem.*, **36**, 706–23 (1964).
24. *Romette J.L., Boitieux J.L.* Computerised enzyme electrodes. *J. Biomed. Eng.*, **6**, 171–4 (1984).
25. *Ryan M.D., Wilson G.S.* Some considerations in spectroelectrochemical evolution of homogeneous electron transfer involving biological molecules. *Anal. Chem.*, **47**, 885–90 (1975).
26. *Shichiri M., Kawamori R., Hakiu N., Yamasaki Y., Abe H.* Wearable-type artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor. *Lancet*, **2**, 1129–31 (1982).
27. *Shichiri M.* Closed loop glycemic control with a wearable artificial endocrine pancreas. *Diabetes*, **33**, 1200–2 (1984).
28. *Weibel M.K., Duke R.F., Page D.S., Bulgrin V.G., Luthy J.* The glucose oxidase mechanism: enzyme activation by substrate. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3904–9 (1969).

Перенос электрона от биологических молекул на электроды

М. Ф. Кардози, Э. П. Ф. Тернер

15.1. Введение

В последнее десятилетие наблюдается огромный интерес к разработке дешевых надежных биосенсоров как клинического, так и промышленного назначения. Один из способов достижения этой цели заключается в объединении биологического катализатора с электрохимическим датчиком, в результате чего получается устройство, одновременно специфичное и простое в обращении. Кроме того, сенсоры на основе электрохимических датчиков обеспечивают наиболее прямой способ преобразования концентрации анализируемого вещества в электрический сигнал, и их легко подключить к следящим и контролирующим электрическим схемам [48].

Простейший ферментный электрод включает находящийся в непосредственной близости к активной поверхности преобразователя тонкий слой фермента (или ферментов), подходящий электрод сравнения и цепь для измерения либо разности потенциалов между двумя электродами (потенциометрия), либо протекающего между ними тока (амперометрия)*. Обычно электрод покрывают мембраной, которая служит для защиты его от загрязнения и/или благодаря которой происходит распределение частиц на границе раздела фаз. При измерениях ферментный электрод просто погружают в раствор, содержащий определяемое вещество, и считывают стационарный ток или потенциал. Для амперометрического электрода амплитуда сигнала и концентрация связаны линейной зависимостью; для потенциометрического электрода — логарифмической.

В потенциометрическом ферментном электроде чувствительный элемент действует подобно батарее, генерирующей разность потенциалов, которую измеряют относительно электрода сравнения в условиях нулевого тока. При этом отсутствует расход вещества, и, следовательно, массоперенос не имеет особого значения, что, конечно, является преимуществом. Такие сенсоры, однако, имеют и два серьезных недостатка: во-первых, точную информацию о концентрации анализируемого вещества в растворе можно получить, только если на поверхности электрода устанавливается локальное термодинамическое равновесие. Для этого необходимо, чтобы электродные процессы были быстрыми, со стандартной электрохимической константой скорости больше $10^{-2} \text{ см} \cdot \text{с}^{-1}$ [2]. Это существенно ограничивает число систем, которые можно использовать в качестве индикаторных электродов. Во-вторых, зависимость концентрации анализируемого вещества C от потенциала электрода E является экспоненциальной:

$$\ln C = \text{const} + nEF/RT,$$

где n — заряд иона; F — число Фарадея; R — газовая постоянная и T — абсолютная температура

* Ферментативная реакция может приводить к образованию электроактивного продукта, который можно определять амперометрически, либо к изменению концентрации каких-либо ионов, например H^+ : в этом случае возможно потенциометрическое определение. — *Прим. авт.*

тура. Поэтому небольшая ошибка при измерении E может привести к довольно значительной погрешности определения C . Например, при $n = 1$ погрешность измерения E в 10 мВ приводит к 19%-ной погрешности для величины C [2]. Из-за этих недостатков биосенсоры на основе амперометрических индикаторных электродов считаются более практичными, хотя в большинстве случаев необходимо строго контролировать гидродинамические условия вблизи поверхности электрода.

Ферменты, принимающие участие в окислении или восстановлении биологических молекул (оксидоредуктазы), либо содержат в активном центре группу, которая может окисляться/восстанавливаться, например железо, медь, флаavin или хинон, либо выполняют свою биологическую роль совместно с каким-либо редокс-кофактором, например NAD(P)^+ . Из-за трудности осуществления прямой электрохимической реакции между редокс-центром и «голым» электродом и отсутствия эффективных электрокаталитических поверхностей для рециклирования восстанавливаемого кофактора в первых ферментных электродах электрохимические процессы лишь косвенно влияли на активность фермента. Классическим примером является сенсор глюкозы на основе фермента глюкозооксидазы и полярографического кислородного электрода, предложенный Кларком и Лайонсом [15] в 1962 г. и усовершенствованный Апдайком и Хиксом [54] в 1967 г. (гл. 1). Глюкозооксидаза представляет собой FAD-содержащий фермент (рис. 15.1), катализирующий окисление глюкозы в глюконовую кислоту:



В каталитическом цикле флавиновая простетическая группа сначала восстанавливается глюкозой и затем реокисляется молекулярным кислородом. Количество присутствующей в растворе глюкозы определяют, следя либо за скоростью расхода кислорода, либо за скоростью образования пероксида водорода. Такая система хотя и функционирует, но все же имеет ряд недостатков. Во-первых, измеряемый ток зависит не только от концентрации глюкозы, но и от парциального давления кислорода ($p\text{O}_2$) в растворе. Во-вторых, при потенциалах восстановления кислорода или окисления пероксида водорода в системе могут протекать различные побочные реакции. Наконец,

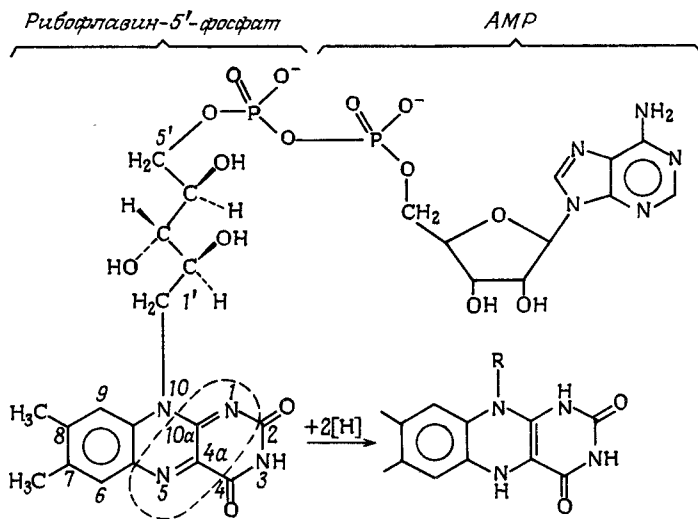
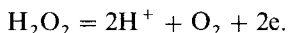


Рис. 15.1. Механизм действия флавинового кофермента. Пунктирной линией выделена область, которая изменяется при протекании реакции.

окисление пероксида водорода до кислорода зависит от концентрации протонов:

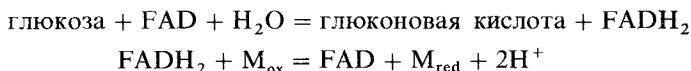


Таким образом, ток может весьма заметно варьировать в зависимости от pH раствора. Ясно, что надежное применение этого датчика возможно лишь при условии, что pH и $p\text{O}_2$ раствора тщательно контролируются, что даже в лабораторных условиях встречается редко. Решение этих проблем позволило бы приступить к разработке ферментных электродов более широкого назначения. О разработке таких электродов и будет идти речь в этой главе.

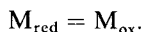
15.2. Медиаторы и химически модифицированные электроды

Хотя для оксидаз, например глюкозооксидазы, молекулярный кислород является физиологическим акцептором электронов, в большинстве случаев его можно заменить переносящим электрон медиатором. В данном контексте под медиатором понимается низкомолекулярная редокс-пара, которая переносит электроны от редокс-центра фермента к поверхности индикаторного электрода. В каталитическом цикле медиатор сначала реагирует с восстановленным ферментом и затем диффундирует к поверхности электрода, где подвергается быстрой электрохимической реакции с переносом заряда. Это можно проиллюстрировать на примере системы с глюкозооксидазой, где протекают следующие процессы:

в растворе:



на электроде:



Скорость образования в растворе восстановленного медиатора M_{red} измеряют амперометрически, окисляя его на электроде.

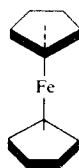
Использование медиатора дает ряд явных преимуществ. При условии, что медиатор в восстановленной форме не реагирует с кислородом, результаты измерений становятся фактически независимыми от $p\text{O}_2$. Во-вторых, рабочий потенциал ферментного электрода теперь определяется формальным окислительно-восстановительным потенциалом (E^0) медиаторной пары, что особенно удобно, если значение E^0 мало, поскольку при этом меньше вероятность протекания побочных реакций. Наконец, если в процессе окисления восстановленного медиатора не участвуют протоны, то ферментный электрод может быть относительно нечувствителен к изменениям pH (очевидно, что прибор нельзя эксплуатировать при очень низких или высоких pH, где имеет место денатурация фермента).

Использование медиаторов в сочетании с оксидоредуктазами никоим образом не является нововведением. В качестве медиаторов более или менее успешно служат молекулы (например хиноны), органические и неорганические (например феррицианид) ионы, редокс-красители [7]. Для использования на практике медиатор должен удовлетворять следующим критериям:

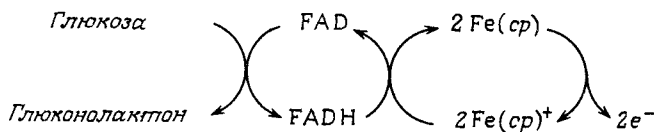
- 1) он должен быстро реагировать с восстановленным ферментом;
- 2) гетерогенные реакции с его участием должны быть обратимыми;
- 3) перенапряжение процесса регенерации окисленного медиатора должно быть низким и не зависеть от pH;

- 4) медиатор должен быть устойчив как в окисленной, так и в восстановленной форме;
- 5) восстановленный медиатор не должен реагировать с O_2 ;
- 6) для многих приложений требуется, чтобы медиатор был нетоксичным.

Хотя использование медиаторов действительно дает явные преимущества, при введении его в раствор образца приходится сталкиваться с некоторыми сложностями. Практичнее было бы прочно поставить медиатор «на якорь» на поверхности электрода так, чтобы он оставался электрохимически активным и мог реагировать с восстановленным ферментом. На сегодняшний день одним из лучших классов медиаторных соединений являются ферроцен (η^5 -бис(циклопентадиенил)железо) и его производные:



Ферроцен представляет собой π -ареновый комплекс переходного металла, который состоит из атома железа, зажатого двумя циклопентадиениловыми кольцами. С электрохимической точки зрения это классическая редокс-пара ($E^0 = 165$ мВ относительно н.к.э.), на физические и химические свойства которой можно влиять, вводя заместитель в любое из двух колец молекулярной системы [43]. Первый успешно работающий ферментный электрод на основе ферроцена содержал нерастворимое производное ферроцена и глюкозооксидазу [11]. Проще говоря, 1,1'-диметилферроцен внедрили в графитовый электрод, на котором химически иммобилизовали глюкозооксидазу (гл. 16). В этой конфигурации электрохимически генерированный ферроцений-ион действует как окислитель восстановленной глюкозооксидазы. Образовавшаяся при этом восстановленная форма ферроцена реокисляется на поверхности электрода в результате поляризации электрода при пропускании тока. Последовательность реакций, протекающих на электроде, можно представить в виде



Такой сенсор имеет следующие преимущества:

- 1) Ферроцений-ионы генерируются при довольно низком потенциале (220 мВ относительно $Ag/AgCl$), что позволяет свести к минимуму побочные реакции.
- 2) Восстановленный ферроцен не реагирует с кислородом и поэтому сенсор не чувствителен к последнему.
- 3) Реакция с переносом электрона между ферроцений-ионом и восстановленным ферментом протекает быстро, соответственно время отклика электрода невелико.
- 4) Вследствие низкой растворимости медиатор фактически закреплен на поверхности электрода, что позволяет не вводить его предварительно в анализируемый раствор.
- 5) Поскольку и сам фермент иммобилизован на поверхности преобразователя, сенсор можно использовать многократно.

Глюкозный электрод, разработанный Кассом и др. [11], проявляет строго линейную функцию к глюкозе за пределами физиологического диапазона концентраций (вплоть до 30 мМ), сохраняя в то же время малые времена отклика (время нарастания

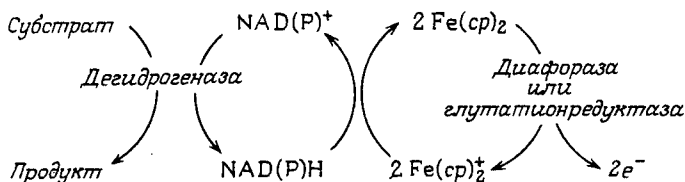
тока до 95% от стационарного уровня составляет 60–90 с). Такие характеристики были достигнуты путем использования покрытого губчатым углем электрода из фольги, что обеспечивает достаточное гидродинамическое ограничение диффузии субстрата без каких-либо дополнительных мембран. При проведении анализа в аэробных и анаэробных условиях сигналы электродов практически одинаковы, а если электрод покрыть мембраной, не пропускающей анионы, то удастся в значительной степени устранить помехи, обусловленные обычно присутствующими в плазме крови метаболитами, такими, как аскорбат.

После первой публикации по этой теме в сочетании с ферроцен-модифицированным электродом использовали множество оксидоредуктаз (табл. 15.1). Этот способ кон-

Таблица 15.1. Ферменты, связываемые с ферроцен-модифицированным углем в ферментных электродах

Субстрат	Фермент
L-Аминокислоты	L-Аминокислотная оксидаза
Оксид углерода	СО-Оксидоредуктаза
Глюкоза	Глюкозооксидаза, или PQQGDH
Гликолевая кислота	Гликолятоксидаза
Лактат	Лактатоксидаза или LDH
NADH	Глутатионредуктаза или диафораза
Пируват	Пируватоксидаза

струирования электродов, видимо, имеет самое общее применение [49]. В таких электродах особенно удачно сочетание с NAD(P)^+ -независимыми дегидрогеназами, например хинопротеинами [50]. Хотя ферроцен-ионы действуют как высокоэффективные переносчики электрона между восстановленными оксидазами и электродами в анаэробных условиях, оксидазы сохраняют природное средство к кислороду. Степень мешающего влияния кислорода в основном определяется относительными концентрациями кислорода и ферроцен-ионов вблизи участка фермента, ответственного за перенос электрона, так как скорости реакций обоих реагентов близки [17]. В результате если анализируемый раствор насыщен кислородом, то амперометрический сигнал типичных оксидазных электродов снижается почти на 30% [11, 20]. В ферроцен-модифицированных электродах, содержащих NAD(P)^+ -независимые дегидрогеназы, эта проблема устраняется полностью. Они не обнаруживают заметного уменьшения тока даже в насыщенных кислородом растворах [5, 19, 52]. Хотя желательно избегать введения таких неустойчивых, дорогих и хорошо растворимых компонентов, как $\text{NAD(P}^+)$, в ферроцен-модифицированных электродах все же можно использовать дегидрогеназы, зависящие от этого кофактора, добавляя в систему второй фермент. С помощью ферроцен-модифицированного электрода можно каталитически сопрягать как липоамиддегидрогеназу (диафоразу), так и глутатионредуктазу. При этом реализуется следующая схема:



Представляет интерес применение электрода на основе глюкозооксидазы и ферроцена для определения других веществ с помощью ферментов, которые конкурируют с глюкозооксидазой. Например, в присутствии АТФ и гексокиназы глюкоза превра-

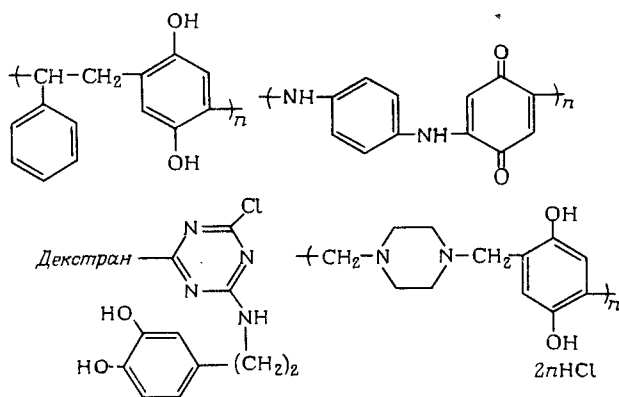


Рис. 15.2. Типы полимеров на основе *n*- и *o*-хинонов, используемых для модификации угольного и платинового электродов.

щается в глюкозо-6-фосфат. Следовательно, глюкозный электрод можно использовать для определения АТФ [8]:



Возможность определения АТФ, NAD^+ и NADP^+ значительно расширяет диапазон доступных для анализа веществ, в том числе клинически важных ферментов. Так, добавление креатинфосфата в описанную выше систему для определения АТФ позволяет определять креатинкиназу, что является важным признаком при диагностике инфаркта миокарда.

До сих пор мы рассматривали примеры различных вариантов глюкозного сенсора на основе ферроцена. Для разработки новых ферментных электродов [45] и иммуносенсоров (гл. 4) можно, однако, использовать и другие ферментные системы.

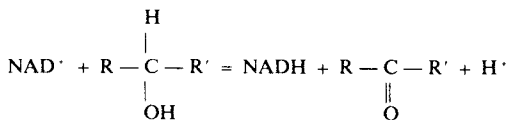
Для регенерации окисленных ферментов используют также модифицированные электроды с адсорбированными редокс-полимерами, содержащими *n*- и *o*-хинонные группы (рис. 15.2) [12–14]. Такие электроды эффективно окисляют восстановленные глюкозооксидазу, *L*-лактатоксидазу и ксантинооксидазу в диапазоне потенциалов от 0,05 до 0,5 В (относительно Ag/AgCl) при pH 7. Установлено [12–14], что эти ферменты окисляются при потенциале окисления полимерного модификатора, и, таким образом, последний действует как медиатор. Основной недостаток этих редокс-полимерных электродов заключается в том, что они довольно быстро (обычно за 5 дней) теряют каталитическую активность [12, 14]. Позже был описан [3] амперометрический глюкозный сенсор на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на графите, который предварительно обрабатали *N*-метилфеназином (NMP). Авторы нашли, что функция электрода к глюкозе строго линейна в диапазоне 0,5–150 мкМ, но использовать его можно вплоть до концентрации 2 мМ. Иммобилизованная глюкозооксидаза стабильна в течение нескольких месяцев, однако медиатор следует обновлять ежедневно.

15.3. Ферментные электроды, основанные на регенерации кофактора

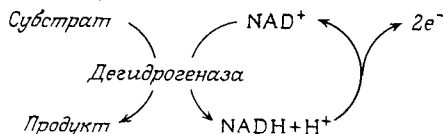
Еще одна группа ферментов, которые можно использовать в биосенсорных устройствах, — это никотинамидадениндинуклеотид-зависимые дегидрогеназы. От рас-

смотренных выше оксидаз эти ферменты отличаются тем, что они не содержат активного редокс-центра Fe-S , а выполняют свою каталитическую функцию с помощью кофактора никотинамиддинуклеотида (рис. 15.3).

С никотинамиддинуклеотидными кофакторами обычно связывают реакции с переносом атома водорода типа



В этой реакции один атом водорода субстрата непосредственно переносится к NAD^+ , а другой переходит в раствор в виде протона. Оба протона, теряемые субстратом, переносятся на никотинамидное кольцо. В амперометрическом ферментном электроде на основе рассматриваемых дегидрогеназ ферментативную активность измеряют рециклированием восстановленного NAD(P)^+ на соответствующем электроде:



При создании биосенсора этого типа существенным элементом является подбор подходящей электрокаталитической поверхности для эффективного реокисления кофермента в биологически активную форму, т.е. в форму, узнаваемую ферментом. В идеальных условиях (0,1 M NADH , pH 7) NAD^+ можно регенерировать из NADH на «голом» электроде. Этот подход, однако, имеет свои недостатки. Для регенерации NAD^+ на платине требуется большое перенапряжение (1,1 В относительно н.к.э.),

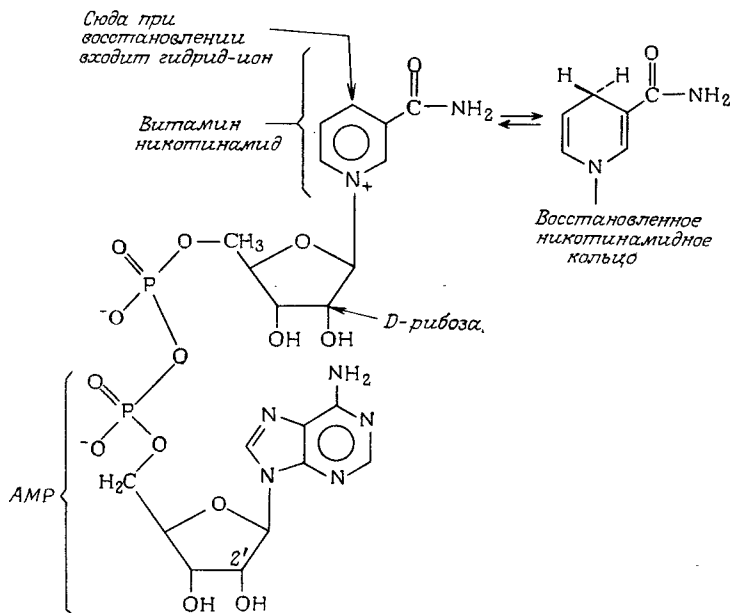
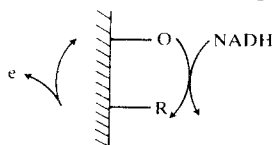


Рис. 15.3. Переносчик водорода кофермент NAD .

и длительное использование электрода приводит к загрязнению его поверхности накапливающимися высокомолекулярными продуктами окисления. Необходимость преодоления этих трудностей привела к разработке модифицированных поверхностей на основе таких веществ, как катехолы [32], гидрохиноны [47] и редокс-красители [24, 29]. При изготовлении химически модифицированных электродов для окисления NADH руководствуются той логикой, что если редокс-пара окисляет NADH в растворе и каким-то образом удерживается на поверхности электрода, то и получающийся при этом модифицированный электрод должен обладать способностью к электрокаталитической регенерации NAD^+ . Для модификации можно использовать просто пассивную адсорбцию редокс-пары на поверхности электрода либо синтетический путь, включающий ковалентное связывание редокс-пары с электродом посредством бифункциональных реагентов, таких как замещенный силан или цианурхлорид. Имеется превосходный обзор Мэррея [42], посвященный химически модифицированным электродам, а кинетические характеристики таких электродов подробно обсуждаются в настоящей книге (гл. 13).

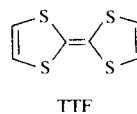
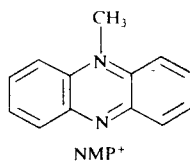
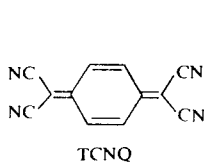
На модифицированном электроде окисление NADH протекает с участием медиатора и катализируется иммобилизованной редокс-парой O/R:



Здесь O и R — окисленная и восстановленная формы поверхностного медиатора. Если скорость медиаторной реакции велика, а скорость восстановления или окисления иммобилизованной пары еще выше, то субстрат (NADH) начинает окисляться при потенциале, близком к стандартному потенциалу E^0 для данной пары O/R. Это значительно уменьшает перенапряжение электрохимической реакции и, таким образом, подавляет посторонние процессы. Кроме того, окисление NADH протекает с высокой эффективностью (относительно рециклирования биологически важного NAD^+) и не загрязняет электрод.

Наряду с отмечаемыми выше достоинствами модифицированные электроды имеют и недостаток — они не могут стабильно работать в течение долгого времени. Обычно нестабильность проявляется десорбцией медиатора с поверхности электрода, что приводит к уменьшению электрокаталитической активности. Особенно это относится к случаям, когда медиатор адсорбирован на поверхности электрода. Хотя медиаторы, ковалентно присоединенные к электродным поверхностям, действительно обеспечивают большую стабильность, это достигается за счет более сложной и часто более длительной химической обработки.

Разработанный недавно новый электрод на основе высокопроводящих органических полимеров оказался наиболее подходящей системой для регенерации NAD^+ из NADH ([1, 34]; гл. 12). В этом электроде использованы устойчивые комплексы с переносом заряда, образующиеся путем частичного переноса электрона от донора, например 7,7,8,8-тетрациано-*n*-хинодиметана (TCNQ), к акцептору, например тетрагиафульвалену (TTF) или *N*'-метилфеназину (NMP).

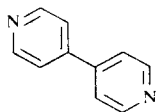


При комнатной температуре эти донорно-акцепторные комплексы являются органическими металлами с проводимостью $500 \text{ Ом} \cdot \text{см}^{-1}$ для TTF^+TCNQ и $200 \text{ Ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ для $\text{NMP}^+\text{TCNQ}^-$ [8]. Химические и физические свойства органических металлов подробно описаны [23], равно как и их электрические характеристики [31]. Окисление NADH на электродах из $\text{NMP}^+\text{TCNQ}^-$ происходит при $-0,2 \text{ В}$ (относительно Ag/AgCl) [34]. Если использовать такие электроды в сочетании с алкогольдегидрогеназой, ток заметно увеличивается в присутствии этанола [36], при этом были получены следующие экспериментальные параметры: кажущаяся $k_M = 15,4 \text{ мМ}$, $i_{\text{max}} = 1,3 \text{ мкА} \cdot \text{см}^{-2}$. Тот же электрод можно использовать для детектирования ацетальдегида в присутствии NADH с кажущейся константой скорости $k_M = 54 \text{ мкМ}$. Предполагается [34], что окисление NADH на $\text{NMP}^+\text{TCNQ}^-$ -электроде протекает по медиаторному механизму и что в ней участвуют генерируемые электрохимически ионы NMP^+ , поскольку комплекс $\text{NMP}^+\text{TCNQ}^-$ не проявляет способности к электрокаталитическому окислению NADH. Прежде чем внедрить дегидрогеназу в реально действующее устройство, необходимо решить проблему введения экзогенного кофактора в раствор. Это требование, очевидно, ограничивает использование таких сенсоров для непосредственных измерений и в режиме «на линии». Одним из путей решения данной проблемы может быть применение избирательно проницаемых мембран для локализации NAD(P)^+ у поверхности электрода. Удержать кофактор у поверхности можно также с помощью химической иммобилизации или за счет увеличения его эффективного молекулярного веса путем ковалентного присоединения к высокомолекулярному веществу, например декстрану ([16], гл. 6).

15.4. Амперометрические сенсоры на основе редокс-белков

Сопряженный амперометрический ферментный электрод этого типа по существу представляет собой устройство, в котором восстановленная оксидоредуктаза не участвует непосредственно в окислительно-восстановительной реакции на поверхности электрода, а перенос заряда осуществляется через дополнительный редокс-белок, например цитохром *c*. Фактически эта конфигурация аналогична описанной выше медиаторной системе, только медиатором является не простой ион, а сложная белковая молекула. В таком сопряженном электроде оксидоредуктаза обеспечивает избирательность сенсора, тогда как редокс-белок служит переносчиком электронов от активного центра на поверхность электрода и обратно. Цитохром *c* оказался удачной моделью редокс-белка в сенсорах этого типа: не только потому, что его электрохимические свойства хорошо изучены, но и потому, что он является естественным природным акцептором электрона в многих комплексах ферментов. (Структура и функции цитохрома *c* подробно рассмотрены в обзоре [44].)

Первые исследования электрохимии цитохрома *c* относятся к началу 70-х гг., когда Бетсо и др. [6] удалось показать, что содержащий железо центр этого белка восстанавливается на ртутном и платиновом электродах, хотя и с низкой скоростью. Несмотря на наблюдаемый в таких системах перенос заряда, их кинетические характеристики непригодны для конструирования биосенсоров. Первый значительный скачок в создании аналитического прибора на основе цитохрома *c* произошел, когда Эддоуз и Хилл [21] описали простой способ обработки золотого электрода, позволяющий добиться квазиобратимого (т. е. быстрого) переноса заряда. Они обнаружили, что добавление 4,4'-дипиридила



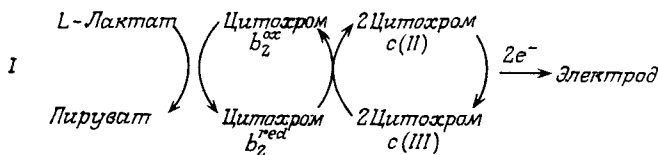
в буферный раствор электролита ускоряет перенос электрона между гемовым центром цитохрома *c* и поверхностью золота. Важно подчеркнуть, что, хотя 4,4'-дипиридил значительно облегчает перенос электрона с гемового центра на золотой электрод, сам он электрохимически неактивен в представляющей интерес области потенциалов и, таким образом, явно не действует как просто переносчик электрона. Считают, что облегчение гетерогенного переноса заряда обусловлено адсорбцией 4,4'-дипиридила на поверхности электрода и быстрым обратимым связыванием цитохрома *c* на границе раздела модифицированный электрод/раствор. Это обеспечивает эффективное сближение белка с поверхностью электрода и правильную его ориентацию, необходимую для быстрого переноса электрона ([13], гл. 13). Важным условием считается также высокая скорость адсорбции/десорбции, иначе может произойти блокирование модифицированной межфазной границы.

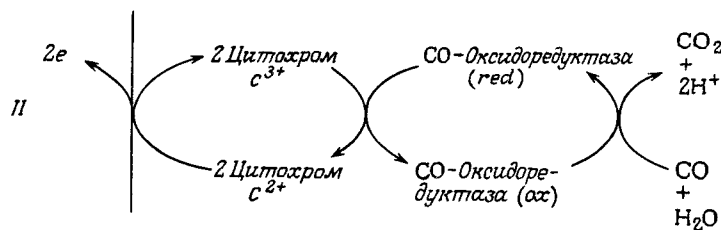
Взаимодействие цитохрома *c* с модифицированным дипиридилем золотым электродом протекает, по-видимому, с участием лизиновых остатков на поверхности белка, образующих водородные связи с одним из атомов азота в промоторе. В основе этого предположения лежит сходство поведения рассматриваемой электрохимической системы и цитохрома *c* при белок-белковом электронном обмене. Известно, например, что полилизин ингибирует реакцию между цитохромом *c* и его биологическим партнером – цитохромоксидазой. При добавлении полилизина в электрохимическую ячейку, содержащую цитохром *c* и модифицированный дипиридилем электрод, гетерогенный перенос заряда также ингибируется. Сходным образом модификация поверхностных боковых цепей цитохрома *c* в равной степени ингибирует как электрохимическую стадию переноса заряда, так и реакцию с цитохромоксидазой [11, 26, 43].

Кроме 4,4'-дипиридила изучены и другие активные молекулы, облегчающие перенос электрона от гемового центра цитохрома *c* на золотой электрод [22]. Так, в присутствии пиридинов (III) и (IV) на золотом электроде получается характерная для этого белка циклическая вольтамперограмма [46].

В работе [4] было обследовано сорок пять бифункциональных органических молекул как возможных промоторов. Авторы пришли к выводу, что промоторами могут служить лишь бифункциональные соединения, содержащие и активную поверхностную группу (основание Льюиса с электроноакцепторными свойствами, обуславливаемыми атомами N, S или P), и слабоосновную или анионную функциональную группу, соответствующим образом ориентированные относительно друг друга. Круг изучаемых промотированных электрохимических реакций недавно удалось расширить с помощью золотых электродов, модифицированных (путем хемосорбции) пиридинальдегидтиосемикарбазонами. Это позволило изучать реакции не только с цитохромом *c*, но и с такими белками, как пластоцианин, у которого имеется отрицательно заряженный участок [28].

Систему цитохром *c* – золотой модифицированный дипиридилем электрод используют в ферментных сенсорах L-лактата [10], оксида углерода [52] и пероксида водорода [27]. Цитохром *c* из сердца лошади восстанавливают по ферментативной реакции





Реакция I катализируется дрожжевым флавоцитохромом *c*, а реакция II – бактериальной СО-оксидоредуктазой [52]. Реакцию цитохрома *c* на модифицированном 4,4'-дипиридилем электроде можно сопрягать через терминальную оксидазу с реакцией восстановления молекулярного кислорода до воды, что позволяет использовать кислородный датчик (рис. 15.4) [28]. Введение в систему цитохрома *c*₅₅₁ («голубой») медьсодержащий белок азурин) оказалось необходимым из-за низкой скорости переноса электрона между цитохромом *c* из сердца лошади и нитратредуктазным цитохромом *cd*₁ из *Pseudomonas aeruginosa*.

Цитохром *c* – (золото) дипиридиловый электрод используют для облегчения переноса заряда в случае как цельных биологических систем, так и выделенных ферментов. Например, помещая указанный электрод в среду с митохондриями из печени крысы или протопластами из *Paracoccus denitrificans*, можно «подпитывать» эти системы электронами с электрода. Кроме того, электроны можно получать от восстанавливающих агентов, таких как NADH, через посредство цитохрома *c* [27]. Хотя не разработано ни одного биосенсора на основе сопряженных интактных биологических систем, возможностей здесь много [27, 51]. Этим способом с электродом, очевидно, можно сопрягать любую систему, окисляющую или восстанавливающую цитохром *c*, что обеспечивает возможность мониторинга различных химических соединений, ферментов, компонентов клеток и даже цельных микроорганизмов.

15.5. Электроды из проводящих органических металлов, сопряженные с оксидазами

Еще одно интересное применение упомянутых выше электродов на основе комплексов с переносом заряда – сопряжение их непосредственно с оксидазами. Так, Кулис и сотр. описали эффективное сопряжение редокс-центров цитохрома *b*₂ (L-лактатферрицитохром(*c*)-оксидоредуктаза) [38], глюкозооксидазы [3], пероксидазы хрена [41] и ксантинпероксидазы [36] с электродами из $\text{NMP}^+\text{TCNQ}^-$ или $\text{NMA}^+\text{TCNQ}^-$ ($\text{NMA}^+ - \text{N}$ -метилакридиний). Конструктивно эти электроды относительно просты: их готовили, либо смешивая порошкообразный фермент с тщательно очищенным препаратом комплекса с переносом заряда и прессуя в виде диска (под давлением ~7 кПа), либо удерживая aliquоту раствора фермента у поверхности электрода с помощью мембраны. Ферментные электроды, содержащие адсорбированный на $\text{NMP}^+\text{TCNQ}^-$ цитохром *b*₂, окисляют L-лактат в диапазоне потенциалов от -0,2 до 0,5 В (относительно н.к.э.). Кажущаяся константа скорости этой реакции k_M для данного электрода составляла приблизительно 2 мМ при i_{max} 25–37 мкА·см⁻². Функция электрода одинакова как в присутствии, так и в отсутствие кислорода. Максимальный ток

Рис. 15.4. Схема реакций биосенсора для определения молекулярного кислорода на основе цитохрома *c*.

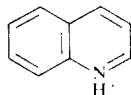


достигается при pH 6,6, тогда как максимум активности нативного фермента приходится на pH 7,2. При комнатной температуре через 3–9 дней электроды еще сохраняют 45–50% их начальной чувствительности.

Электроды с адсорбированной на $\text{NMA}^+\text{TCNQ}^-$ или $\text{NMP}^+\text{TCNQ}^-$ глюкозооксидазой проявляют чувствительность к глюкозе только при потенциалах выше 0,1 В относительно Ag/AgCl , т. е. выше потенциала пика окисления NMP^+ или NMA^+ . Эти электроды отличаются широким диапазоном линейности и высокой стабильностью: электродная функция сохраняется более 100 дней [41].

Электровосстановление пероксида водорода на электродах из $\text{NMA}^+\text{TCNQ}^-$, содержащих адсорбированную пероксидазу, начинается при 0,3–0,5 В. Используя метод вращающегося диска, авторы установили, что этот процесс лимитируется каталитической активностью фермента. Для данной системы $k_M = 80$ мкМ и $i_{\text{max}} = 0,27$ мА·см⁻². Рассчитанная константа скорости гетерогенной реакции составляет $8,5 \cdot 10^{-4}$ см·с⁻¹. Эти электроды в сочетании с глюкозооксидазой используют также для конструирования биферментных сенсоров, чувствительных к глюкозе. Принцип работы таких сенсоров – биоэлектрокаталитическое восстановление пероксида водорода, образуемого под действием глюкозооксидазы.

Позже Элбери и сотр. [2] использовали электроды из органических металлов в качестве эффективных переносящих заряд подложек для редокс-ферментов (гл. 12). Авторы исследовали перенос заряда между глюкозооксидазой и множеством электродов из проводящих органических солей. Общим свойством этих электродов является низкий уровень фонового тока в отсутствие глюкозы. Добавление глюкозы во всех случаях приводит к увеличению тока, причем лучшими материалами оказались комплексы TCNQ^- с NMP^+ , TTF^+ и ионом хинолина Q^+ .



Q⁺

Они характеризуются меньшими фоновыми токами и более широкими рабочими диапазонами напряжений. По данным [2], эта система стабильна: через 28 дней непрерывной работы сигнал глюкозного электрода снижается всего на 20%.

Важный вопрос, который пока не решен, каков точный механизм функционирования электрода, т. е. окисляется ли фермент путем прямого переноса электрона на электрод или же имеет место медиаторный процесс. В последнем случае TTF^+ , NMP^+ и/или TCNQ^- реагирует с ферментом и затем окисляется на электроде. Кулис и его школа [39] утверждают, что в случае электродов, содержащих цитохром *c* и пероксидазу, происходит непосредственный обмен электронами между редокс-центром и электродом. В подтверждение этого авторы ссылаются на то, что ток этих электродов не зависит от потенциала, и на данные кинетических исследований с помощью вращающегося диска [37]. В случае флавиносодержащих оксидаз, глюкозооксидазы и ксантинооксидазы, по мнению Кулиса, процесс протекает с участием медиатора NMP^+ . Этот вывод подтверждается тем, что окисление субстрата происходит только при потенциалах, соответствующих редокс-потенциалу данного медиатора. Авторы полагают, что медиатор образуется в слое вблизи поверхности электрода в процессе постепенного растворения органического металла. В этой связи интересно отметить, что, по данным [35], TCNQ^0 в растворе исключительно эффективно окисляет восстановленную глюкозооксидазу ($k_{\text{ок}} = 0,015$ М⁻¹·с⁻¹). Позже мы показали, что графитовые электроды, модифицированные TCNQ , действуют как эффективные электрокаталитические поверхности при окислении восстановленной глюкозооксидазы и могут работать при довольно низких потенциалах (0 мВ относительно Ag/AgCl). Мы установили также, что TTF^+

является эффективным медиатором для восстановленной глюкозооксидазы как в растворе, так и будучи адсорбирован на поверхности электрода [25]. Элбери и др. [2] не согласны с последним положением и приводят доводы в пользу того, что перенос заряда осуществляется непосредственно к глюкозооксидазе. Основным аргументом авторы считают то, что в экспериментах с вращающимся диском с кольцом им не удалось обнаружить продуктов растворения электрода в потоке, омывающем кольцевой электрод (гл. 12).

15.6. Заключение

Поиск новых соединений-переносчиков электрона-и объяснение механизма их действия будут несомненно продолжаться в ускоренном темпе, чему способствует и коммерческий интерес к выпуску биосенсоров этого типа*. Появятся новые устройства на основе рассмотренной здесь общей технологии, и очевидно, что эта область будет быстро развиваться. Ключ к успеху лежит в создании простых и стабильных конфигураций ферментных электродов, пригодных для массового коммерческого выпуска по невысоким ценам. Мы надеемся, что это будет достигнуто не в ущерб точности и чувствительности, свойственной обычным лабораторным анализам.

Благодарность

Э.П.Ф. Тернер является старшим научным сотрудником British Diabetic Association.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Albery W.J., Bartlett P.N.* An organic conductor electrode for the oxidation of NADH. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 234-6 (1984).
2. *Albery W.J., Craston D.H., Haggitt B.G.D.* The development of novel biosensors. In *The World Biotech Report 1985*, vol. 1, 359-82. Online Publications, Pinner, U.K., 1985.
3. *Albery W.J., Eddowes M.J., Hill H.A.O., Hillman A.R.* Mechanism of the reduction and oxidation of cytochrome *c* at a modified gold electrode. *J. Amer. Chem. Soc.*, **103**, 3904-10 (1981).
4. *Allen P.M., Hill H.A.O., Walton N.J.* Surface modifiers for the promotion of direct electrochemistry of cytochrome *c*. *J. Electroanal. Chem.*, **178**, 69-86 (1984).
5. *Aston W.J., Ashby R.E., Higgins I.J., Scott L.D.L., Turner A.P.F.* Enzyme based methanol sensor. In *Charge and field effects in biosystems* (eds. M.J. Allen, P.N.R. Usherwood), pp. 491-8. Abacus Press, Turnbridge Wells, 1984.
6. *Betso S.R., Klepper M.H., Anderson L.B.* The electrochemical behaviour of cytochrome *c*. *J. Amer. Chem. Soc.*, **94**, 8197-204 (1972).
7. *Bright H.J., Porter D.J.T.* In *The enzymes* (ed. H. Boyer), vol. 12, 421-86. Academic Press, New York, 1975.
8. *Bryce M.R., Murphy L.C.* Organic metals. *Nature*, **309**, 119-26 (1984).
9. *Cass A.E.G.* Protein electrochemistry. *Life Chem. Reports*, **2**, 321-362 (1984).
10. *Cass A.E.G., Davis G., Hill H.A.O., Nancarrow D.J.* The reaction of flavocytochrome b_2 with cytochrome *c* and ferricinium carboxylate. Comparative kinetics by cyclic voltammetry and chronoamperometry. *Biochim. Biophys. Acta*, **828**, 51-7 (1985).
11. *Cass A.E.G., Francis D.G., Hill H.A.O., Aston W.J., Higgins I.J., Plotkin E.V., Scott L.D.L., Turner A.P.F.* Ferrocenemediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.*, **56**, 667-71 (1984).
12. *Cenas N.K., Kanapieniene J.J., Kulys J.J.* NADH oxidation by quinone electron acceptors. *Biochem. Biophys. Acta*, **767**, 108-12 (1984).

* Хотя в качестве примера всегда приводят сенсоры глюкозы, следует подчеркнуть важность поиска схемы, пригодной для широкого круга ферментативных реакций, поскольку это будет способствовать созданию сенсоров многоцелевого назначения. - *Прим. авт.*

13. *Cenas N.K., Pocius A.K., Kulys J.J.* Electron exchange between flavin and heme containing enzymes and electrodes modified by redox polymers. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **11**, 61–73 (1983).
14. *Cenas N.K., Kulys J.J.* Bioelectrocatalytic conversion of substances on polymer modified electrodes. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **12**, 583–91 (1984).
15. *Clark L.C., Lyons C.* Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **102**, 29–33 (1962).
16. *Davies P., Mosbach K.* The application of immobilized NAD^+ in an enzyme electrode and in model enzyme reactors. *Biochim. Biophys. Acta*, **370**, 329–338 (1974).
17. *Davis G.* Electrochemical techniques for the development of amperometric biosensors. *Biosensors*, **1**, 161–78 (1985).
18. *Davis G.* Studies in applied bioelectrochemistry. Ph.D. Thesis, University of Oxford, 1984.
19. *D'Costa E.J., Higgins I.J., Turner A.P.F.* Quinoprotein glucose dehydrogenase and its application in an amperometric glucose sensor. *Biosensors*, **2**, 71–89 (1986).
20. *Dicks J.M., Aston W.J., Davis G., Turner A.P.F.* Mediated amperometric biosensors for D-galactose, glycolate and L-amino acids based on a ferrocene-modified carbon paste electrode. *Anal. Chim. Acta*, **182**, 103–112 (1986).
21. *Eddowes M.J., Hill H.A.O.* A novel method for the investigation of the electrochemistry of metalloproteins: cytochrome *c*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 71 (1977).
22. *Eddowes M.J.* Binding as a prerequisite for rapid electron transfer reactions of metalloproteins. *Am. Chem. Soc. Adv. Chem. Ser.*, **201**, 173–8 (1982).
23. *Engler E.M.* Organic metals. *Chemtech.*, **4**, 274–9 (1976).
24. *Gorton L., Torstensson A., Jaegfeldt H., Johansson G.* Electrochemical oxidation of reduced nicotinamide coenzymes by graphite electrodes modified with an adsorbed phenoxazinium salt, Meldola Blue. *J. Electroanal. Chem.*, **161**, 103–20 (1984).
25. *Higgins I.J., Hill H.A.O.* Microbial generation and interconversion of energy sources. In *Microbial Technology*, (eds. A.T. Bull, D.C. Ellwood, C. Ratledge), Society of General Microbiology Symposium, No. 19, 1979, pp. 359–76.
26. *Higgins I.J.* Bioelectrochemistry. *Essays in Biochemistry*, **21**, 119–45 (1985).
27. *Higgins I.J., Best D.J., Hammond R.C.* New findings in methane-utilising bacteria highlight their importance in the biosphere and their commercial potential. *Nature*, **286**, 561–4 (1980).
28. *Hill H.A.O., Walton N.J., Higgins I.J.* Electrochemical reduction of dioxygen using a terminal oxidase. *FEBS Lett.*, **126**, 282–4 (1981).
29. *Huck H., Schelter-Graf A., Danzer J., Kirch P., Schmidt H.* Bioelectrochemical detection systems for substrates of dehydrogenases. *Analyst*, **109**, 147 (1984).
30. *Jaeger C.D., Bard A.J.* Electrochemical behaviour of tetrathiafulvalene tetracyanoquinodimethane electrodes in aqueous media. *J. Amer. Chem. Soc.*, **101**, 1690–99 (1978).
31. *Jaeger C.D.* Electrochemical behaviour of donor-tetracyanoquinodimethane electrodes in aqueous media. *J. Amer. Chem. Soc.*, **102**, 5435–42 (1980).
32. *Jaegfeldt H., Torstensson A.B.C., Gorton L.G.O., Johansson G.* Catalytic oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide by graphite electrodes modified with adsorbed aromatics containing catechol functionalities. *Anal. Chem.*, **53**, 1979–82 (1981).
33. *Jonsson G., Gorton L.* An amperometric glucose sensor made by modification of a graphite electrode surface with immobilized glucose oxidase and adsorbed mediator. *Biosensors*, **1**, 355–68 (1985).
34. *Kulys J.J.* Development of new analytical systems based on biocatalysers. *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 342–52 (1981).
35. *Kulys J.J., Cenas N.K.* Oxidation of glucose oxidase from *Penicillium vitale* by one- and two-electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta*, **744**, 57–63 (1983).
36. *Кулис Ю. Ю., Разумас В. Й.* Биокатализ в электрохимии органических соединений. Вильнюс: Мокслас, 1983, 170 с.
37. *Кулис Ю. Ю., Самалюс А. С.* Ускорение электродных процессов биокатализаторами. Труды АН ЛитССР. 1982. В. № 2/129. С. 3–9.
38. *Кулис Ю. Ю., Швирмицкас Г.-Ю. С.* Биозлектрокатализ. Перенос электронов с активного центра цитохрома b_2 на органические металлы. Докл. АН СССР. 1979. Т. 245. № 1. С. 137–40.
39. *Kulys J.J.* Reagentless lactate sensor based on cytochrome b_2 . *Anal. Chim. Acta*, **117**, 115–20 (1980).
40. *Kulys J.J., Pestiakiene M.V., Samalius A.S.* The development of bienzyme glucose electrodes. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **8**, 81–8 (1981).
41. *Kulys J.J., Samalius A.S., Sirmickas G.J.S.* Electron exchange between the enzyme active centre and organic metal. *FEBS Lett.*, **144**, 7–15 (1980).
42. *Murray R.W.* Chemically modified electrodes. In *Electroanalytical chemistry* (ed. A. J. Bard), vol. 13, pp. 191–387. Marcel Dekker, New York, 1984.
43. *Pickett.* Electrochemistry of metal complexes. In *Electrochemistry* (ed. D. Pletcher), Vol. 9, pp. 162–221. Roy. Soc. Chem., London, 1984.
44. *Salemme R.* Structure and function of cytochrome *c*. *Ann. Rev. Biochem.*, **46**, 229–39 (1977).

45. Scheller F.W., Rennberg F.S.R., Müller H., Janchen M., Weise H. Biosensors: trends and commercialization. *Biosensors*, **1**, 135–61 (1985).
46. Taniguchi I., Toyosawa K., Tamaguchi M., Yasukouchi K. Voltammetric response of horse heart cytochrom *c* at a gold electrode in the presence of sulphur bridged bipyridines. *J. Electroanal. Chem.*, **140**, 187–93 (1982).
47. Tse D.C.S., Kuwana T. Oxidation of NADH at a modified electrode. *Anal. Chem.*, **49**, 1589–95 (1977).
48. Turner A.P.F. Biosensors for process monitoring and control. In *The World Biotech. Report 1985*, vol. 1, pp. 181–92. Online Publications, Pinner, UK, 1985.
49. Turner A.P.F. Amperometric biosensors based on mediator-modified electrodes. In *Methods in enzymology: immobilized enzymes and cells* (ed. K. Mosbach). Academic Press, New York, 1988.
50. Turner A.P.F., D'Costa E.J., Higgins I.J. The use of glucose dehydrogenase and other quinoproteins in analytical systems. In *Enzyme Engineering*. Plenum, New York, 1986.
51. Turner A.P.F., Ramsay G., Higgins I.J. Applications of electron transfer between biological systems and electrodes. In *Industrial and Medical Applications of Bioelectrochemistry*. *Biochem. Soc. Trans.*, **11**, 445–448 (1983).
52. Turner A.P.F., Hendry S.P., Cardosi M.F. Tetrathiofulvalene: new mediator for amperometric biosensors. In *Biosensors, Instrumentation and Processing*. Online, London, 1987, pp. 125–37.
53. Turner A.P.F., Aston W.J., Davis G., Higgins I.J., Hill H.A.O., Colby J. Enzyme based carbon monoxide sensors. In *Microbial Gas Metabolism* (eds. R. K. Poole, D. S. Dow). Academic Press, New York, 1984, pp. 161–70.
54. Updike S.J., Hicks G.P. The enzyme electrode. *Nature*, **214**, 986–8 (1967).

Конструирование медиаторных амперометрических биосенсоров

У. Дж. Астон

Идеальный метод определения веществ, будь то анализ медицинских или промышленных объектов, должен быть простым в использовании, быстрым, недорогим, чувствительным, точным и правильным и требовать лишь устойчивых и безвредных реагентов. Многим этим требованиям удовлетворяют биологические катализаторы-ферменты, обладающие способностью катализировать специфические реакции в смесях в мягких условиях. Именно эти свойства ферментов, наряду с возрастающей доступностью, привели к тому, что они стали внедряться в лабораторную диагностику, вытесняя многие используемые прежде неферментные методы анализа, в том числе химические окислительно-восстановительные и конденсационные методы [13]. Для химических методов характерно завышение результатов за счет побочных реакций с присутствующими в крови веществами, а в реакциях конденсации используются такие опасные реагенты, как горячая концентрированная серная кислота. Известно много методов определения такого часто встречающегося метаболита, как глюкоза [21], но в качестве стандартного в США рекомендован спектрофотометрический метод, основанный на двух ферментативных реакциях [20]. В присутствии глюкозы ферменты гексокиназа (EC 2.7.1.1) и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (EC 1.1.1.49) катализируют образование NADH, что приводит к увеличению измеряемого светопоглощения при 340 нм. Распространена методика с использованием глюкозооксидазы. Продукт реакции определяют спектрофотометрически, вводя в систему пероксидазу (EC 1.11.1.7) и фиксируя изменение окраски хромогенного реагента, например *o*-дианизидина в процессе окисления пероксида водорода [16]. Применение хромогенов привело к появлению новых методов обнаружения — с помощью так называемых систем «сухой химии», в которых все реагенты и вспомогательные вещества наносят в сухом виде на бумагу или пластиковый носитель. Таким образом, отпадает необходимость в приготовлении растворов реагентов [27, 33]. Предложены и другие методики анализа, такие как калориметрические [19] и оптико-электронные [18], однако электрохимические, в частности амперометрические, методы остаются наиболее реальной альтернативой традиционным методам биохимического анализа. Темой данной главы и является конструирование устройств для амперометрического анализа и перспективы их развития.

Функционирование большинства электрохимических биосенсоров основано на измерении расхода или образования под действием фермента природных электрохимически активных веществ. Например, глюкозу можно определять по количеству образующего пероксида водорода или расходу кислорода под действием глюкозооксидазы (гл. 1). В литературе описано множество электрохимических биосенсоров [2, 7], однако лишь немногие из них выпускаются серийно ([30], гл. 18). Альтернативой им являются биосенсоры, в которых биологическая окислительно-восстановительная реакция сопрягается электродом при помощи медиатора и амперометрически измеряется поток

электронов. К многочисленным достоинствам ферментных электродов как аналитических приборов относится то, что они требуют минимальной предварительной подготовки образцов. При таком анализе пробы обычно не разрушаются, так что их можно использовать и для других определений. Наконец, время отклика амперометрических биосенсоров хотя и зависит от различных химических и физических факторов, но обычно невелико и находится в пределах 30–600 с.

16.1. Биотопливные элементы

Биологические топливные элементы представляют собой устройства, в которых реакции на одном или обоих электродах реализуются биокаталитически при умеренных температурах и давлениях. Разнообразие метаболизма микроорганизмов позволяет использовать широкий круг топлив, включая многие промышленные отходы. При этом в элемент могут быть включены либо целые микроорганизмы ([4], гл. 17), либо ферментные препараты [17, 22]. В зависимости от способа взаимодействия биологического катализатора с электродом биотопливные элементы обычно делят на два типа: 1) элементы, в которых топливо, например водород, генерируют биологически в отдельной камере, а затем подают в электродное отделение для последующего электрохимического окисления; 2) элементы, в которых непрерывное поступление электронов обеспечивается прямым взаимодействием биокатализатора с электродом, причем этот процесс часто облегчается при использовании медиатора. Последний должен быть способен к быстрому обратимому переносу электрона и иметь окислительно-восстановительный потенциал, близкий к потенциалу биологического катализатора, от которого он переносит электроны к электроду. От медиатора требуется также, чтобы он не мог служить субстратом для катализатора, был нетоксичен и химически устойчив длительное время как при хранении, так и в работе. Биотопливные элементы второго, т.е. медиаторного, типа и рассматриваются в этом разделе.

Биотопливные элементы обычно состоят из двух инертных электродов из золота, платины или углерода, погруженных в буферный раствор. Перед использованием электроды очищают ультразвуковой обработкой в буферном растворе или циклической вольтамперометрической обработкой в серной кислоте (500 мМ) в диапазоне потенциалов от $-0,26$ до $+1,3$ В (относительно н.к.э.) до тех пор, пока не будут наблюдаться отчетливые пики окисления водорода и восстановления кислорода [24]. Электроды разделены ионообменной мембраной; анодное отделение продувают воздухом (или кислородом), катодное – азотом (рис. 16.1). Мембрана позволяет пространственно разделить реакции, протекающие в электродных отделениях элемента, и в то же время обеспечивает обмен протонами между ними. Подходящие для биосенсоров мембраны разных типов выпускаются в Великобритании многими фирмами (BDH, Ltd., DuPont(UK) Ltd.).

Биотопливный элемент более эффективен, если азот предварительно пропустить через газоочистное устройство Nilox (выпускается фирмой Jencons Scientific Ltd., Великобритания) и затем через воду. Это снижает мешающее влияние кислорода и потери раствора вследствие испарения. Введение глюкозы в биотопливный элемент, содержащий глюкозооксидазу и растворимый медиатор, например N,N,N',N' -тетрамил-*n*-фенилендиамин TMPD (табл. 16.1), при 20°C приводит к возникновению потока электронов от фермента к аноду через медиатор. По внешней цепи электроны идут к катоду, где в идеальных условиях в присутствии протонов и кислорода образуется вода (рис. 16.2). Результирующий ток, измеряемый по падению напряжения на калиброванном сопротивлении, пропорционален добавке скоростьопределяющего компонента, пока не достигнуто насыщение. Измеряя стационарные токи, можно быстро (в пределах 5 с) определять даже малые концентрации глюкозы – до $0,1$ мМ

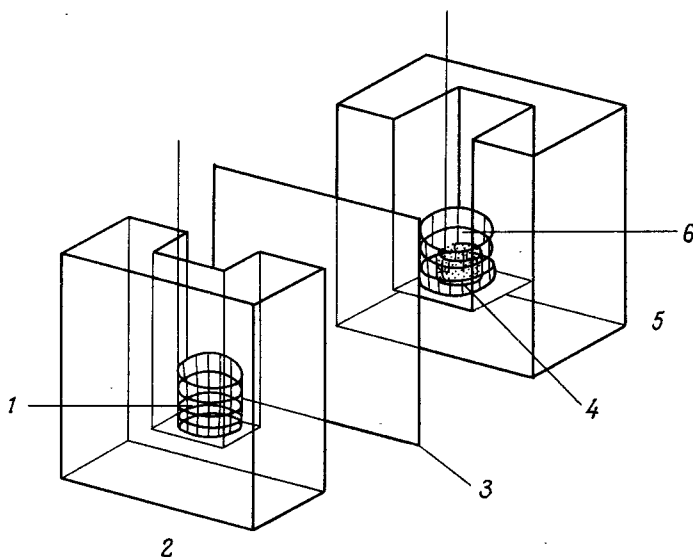


Рис. 16.1. Биотопливный элемент в разобранном виде. Корпус элемента выполнен из плексигласа, анодное и катодное отделения ($35 \times 16 \times 15$ мм и $35 \times 15 \times 11$ мм соответственно) разделены ионообменной мембраной. Устройство ячейки описано в тексте (см. также табл. 16.1). 1 – катод из платиновой сетки; 2 – катодное отделение, продуваемое воздухом или кислородом; 3 – ионообменная мембрана; 4 – мешалка; 5 – анодное отделение, продуваемое азотом; 6 – анод из платиновой сетки.

Таблица 16.1. Компоненты биотопливного элемента на основе глюкозооксидазы с медиатором N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамином (TMPD)

Анодное отделение	Катодное отделение
Ацетатный буферный раствор (50 мМ, pH 4,5) Хлорид натрия (150 мМ) Медиатор (TMPD) (8,0 мМ) Глюкозооксидаза (8,0 мг) Общий объем 4,2 мл Pt электрод (50 меш) $1,6 \times 4,8$ см Продувается азотом, очищенным от кислорода, и перемешивается магнитной мешалкой	Ацетатный буферный раствор (50 мМ, pH 4,5) Хлорид натрия (150 мМ) Общий объем 3,5 мл Pt электрод (50 меш) $1,6 \times 4,8$ см Продувается воздухом

(рис. 16.3). Для определения более низких концентраций измеряют прошедший через систему заряд, интегрируя площадь под кривой в координатах ток–время.

Как сенсор описанный биотопливный элемент имеет определенные ограничения, связанные с присутствием самоокисляемого медиатора (впрочем, самоокисление можно свести к минимуму, используя нерастворимый медиатор [17]), требованиям к кислородному катоду и особенно мембране. Последняя должна удерживать фермент и в то же время пропускать низкомолекулярные компоненты – газ, медиатор, субстрат. Ионообменные мембраны, как правило, удовлетворяют этим требованиям, хотя их диффузионные свойства зависят от pH буферного раствора [31]. На работу элемента влияет также изменение скорости перемешивания раствора в анодном отделении

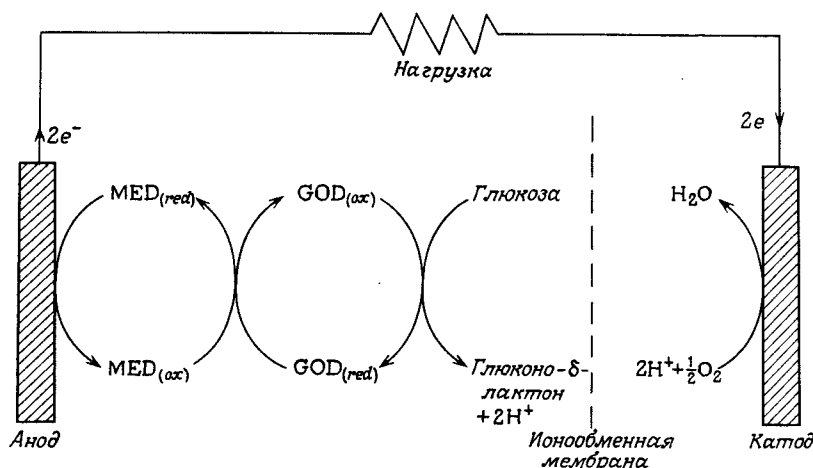


Рис. 16.2. Схема биотопливного элемента на основе глюкозооксидазы: $MED_{(ox/red)}$ – окисленная и восстановленная формы медиатора; $GOD_{(ox/red)}$ – окисленная и восстановленная протестическая группа фермента.

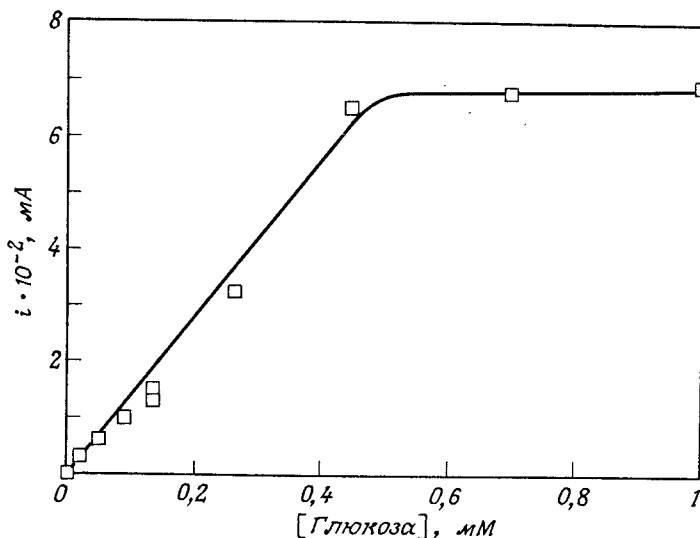


Рис. 16.3. Стационарный ток биотопливного элемента на основе глюкозооксидазы, измеренный по падению напряжения на калиброванном сопротивлении.

(перемешивание необходимо для ускорения переноса электрона с комплекса фермент–медиатор на электрод). Диффузия компонентов через мембрану приводит к снижению эффективности переноса электрона вследствие побочных реакций. Из-за этих ограничений биотопливный элемент непригоден как сенсор в большинстве случаев, где требуется количественное определение субстрата.

16.2. Ячейки с задаваемым потенциалом

Функции воздушного катода и полупроницаемой мембраны в биотопливном элементе может выполнять обычный или управляемый компьютером потенциостат.

Это устройство поддерживает потенциал рабочего электрода электрохимической ячейки на заданном уровне относительно электрода сравнения, например каломельного.

Мешающее влияние кислорода можно уменьшить, используя независимый от кислорода фермент, например метанолдегидрогеназу. Этот фермент способен окислять первичные спирты до соответствующих альдегидов и кислот. Введение метанолдегидрогеназы в ячейку с фиксированным потенциалом рабочего электрода, содержащую растворимый медиатор (этосульфат феназина), позволяет определять метанол в концентрациях намного меньших, чем это возможно в обычной газожидкостной хроматографии [3]. Основой этого устройства (рис. 16.4) был реакционный сосуд с водяной рубашкой вместимостью 5,0 мл (Quickfit, Gallenkamp and Co. Ltd., Великобритания), термостатированный при 30 °С. Ячейку заполняли боратным буферным раствором (3,0 мл, 250 мМ, рН 9,0), содержащим хлорид аммония (50 мМ), этосульфат феназина (1,0 мМ) и неочищенный экстракт из *Methylosinus trichosporium* (3,0 мг белка), выделяемый из микроорганизмов, растущих на метане как единственном источнике углерода и энергии [25]. Реакционную смесь непрерывно продували азотом и перемешивали с помощью магнитной мешалки. Рабочий платиновый электрод очищали циклической катодно-анодной обработкой, погружали в реакционную

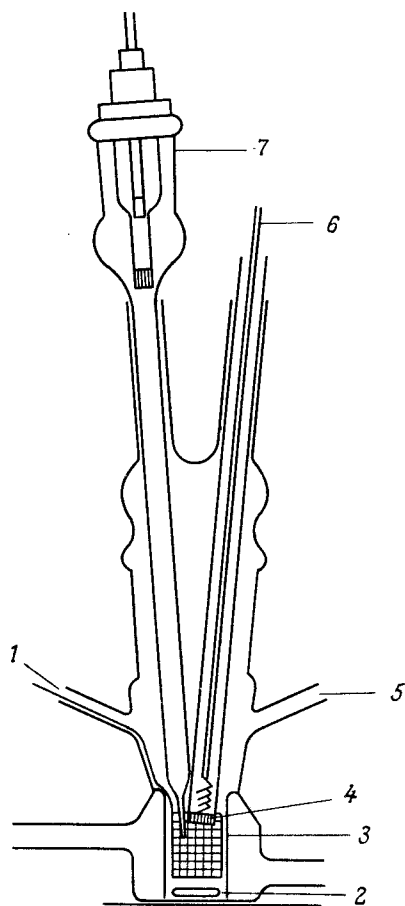


Рис. 16.4. Схема ферментного сенсора с фиксированным потенциалом, содержащего растворимые компоненты. Пояснения даны в тексте. 1—газообразный азот; 2—магнитная мешалка; 3—платиновый электрод—сетка; 4—пробка из пористого стекла; 5—ввод пробы; 6—платиновый противэлектрод; 7—стандартный каломельный электрод сравнения.

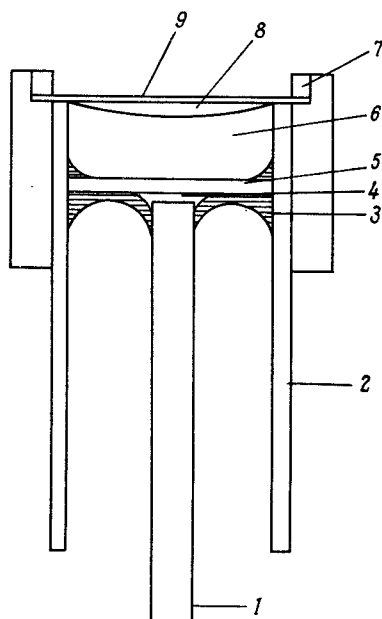
смесь и поддерживали потенциал +100 мВ с помощью потенциостата фирмы Н. В. Thompson and Associates, Великобритания. Использовали платиновый противозлектрод, изолированный от реакционной смеси пористым стеклом. Измеряя с помощью вычислительного интегратора CDP4 (фирмы Pye Unicam Ltd., Великобритания) заряд, проходящий через систему при добавлении в нее аликвоты анализируемого раствора, можно определять малые концентрации формальдегида и метанола вплоть до 0,02 мкМ.

В качестве электрохимического сенсора эта ячейка имеет много преимуществ перед описанным выше биотопливным элементом. Прежде всего в ней не используется мембрана и не требуется продувание кислородом. Однако, как и в случае биотопливного элемента, здесь имеет значение скорость перемешивания, и в присутствии самоокисляющегося медиатора необходимо поддерживать анаэробные условия. Альтернативным решением является использование несамоокисляющегося медиатора, например ферроцена, который эффективно переносит заряд независимо от давления кислорода. Ферроцен и его производные представляют собой группу металлоорганических соединений, способных переносить один электрон между оксидоредуктазами (такими, как глюкозооксидаза, пируватоксидаза, ксантинооксидаза, оксалактоксидаза, липоамиддегидрогеназа, глутатионредуктаза [8]) и хинопротеинами [14] (например, метанолдегидрогеназой [3], глюкозодегидрогеназой [12] и лактатдегидрогеназой [23]). Введение в описанный выше метанольный сенсор растворимого производного ферроцена, диметил-триметилферроценметиодата (1,0 мМ), позволяет определять метанол в концентрациях до 3,0 мкМ независимо от колебаний давления кислорода. В подтверждение этого измеряли ток пика и проходящий заряд при продувании ячейки либо кислородом, либо азотом. Описанный прибор не требует высококвалифицированного обслуживания и дорогостоящего оборудования. Однако на его работу влияет интенсивность перемешивания, объем реакционной смеси и температура.

16.3. Конструкция медиаторных амперометрических датчиков

Для конструирования датчиков можно использовать углеродные пасты, в которые введен нерастворимый медиатор. Пасту, состоящую из графита (2,5 г), жидкого парафина (1,5 мл) и медиатора (250 мг), тщательно перемешивают и помещают в специальное углубление в торце электрода (рис. 16.5). Сам электрод выполнен в виде пластикового диска, закрепленного на расстоянии 2 мм от конца стеклянной трубки диаметром 6 мм с помощью непроводящей эпоксидной смолы (фирмы Ciba-Geigy Ltd., Великобритания). Контакт электрода с внешней цепью осуществляется через одножильный провод, приклеенный к диску эпоксидной смолой с серебряным наполнителем [1]. Перед использованием платиновый диск очищают с помощью суспензии оксида алюминия (0,2 мкМ). Фермент удерживают на поверхности пастового электрода мембраной, фиксируемой кольцом в натянутом состоянии. Данный способ пригоден для гибких мембран, а жесткие мембраны, например ионообменные, закрепляются в специальном держателе (рис. 16.5). Выбор мембраны из множества выпускаемых промышленностью материалов (например, диализные мембраны, фильтры Nuclepore) определяет время отклика, наличие помех и диапазон линейности электродной функции биосенсора. Для глюкозного электрода с диализной мембраной функция линейна вплоть до концентрации 15 мМ (рис. 16.6). Как и в случае описанных выше систем, время отклика электрода мало – сигнал выходит на стационарный уровень в течение минуты. В общем случае чем тоньше слой пасты, тем более воспроизводим сигнал электрода. При потенциале +150 мВ (относительно н.к.э.) для электрода на основе глюкозооксидазы и 1,1-диметилферроцена со слоем пасты толщиной 1 мм в отсутствие глюкозы фоновый ток составлял $1,2 \text{ мА} \pm 0,5\%$ (среднее из десяти измерений). При

Рис. 16.5. Сенсор с графитовым пастовым электродом и мембраной, удерживающей фермент на его поверхности. Электрод представляет собой платиновый диск диаметром 6,0 мм, закрепленный в пастеровской пипетке с помощью проводящих и непроводящих смол, как описано в тексте. 1—соединительный провод; 2—изолирующая стеклянная трубка; 3—изолирующая смола; 4—проводящий клей; 5—платиновый электрод; 6—проводящий гель; 7—фиксирующее кольцо; 8—ферментный слой; 9—мембрана.



толщине слоя пасты 3 мм фоновый ток был равен $1,4 \pm 2,0\%$. В присутствии глюкозы (5,0 мМ) токи этих электродов составляли соответственно $1,4 \text{ мА} \pm 0,64\%$ и $1,6 \pm 2,5\%$.

Можно получить поверхность с более воспроизводимыми свойствами, если с помощью стеклянной сферы в углеродной пасте сделать лунку и затем поместить в нее необходимые компоненты (рис. 16.5). Введя в сенсор СО-оксидоредуктазу и поместив в держатель мембраны хлоридсеребряный электрод сравнения в соответствующем буферном растворе, сенсор можно использовать для определения газообразного оксида углерода [32].

Ковалентная иммобилизация глюкозооксидазы в присутствии 1,1-диметилферроце-

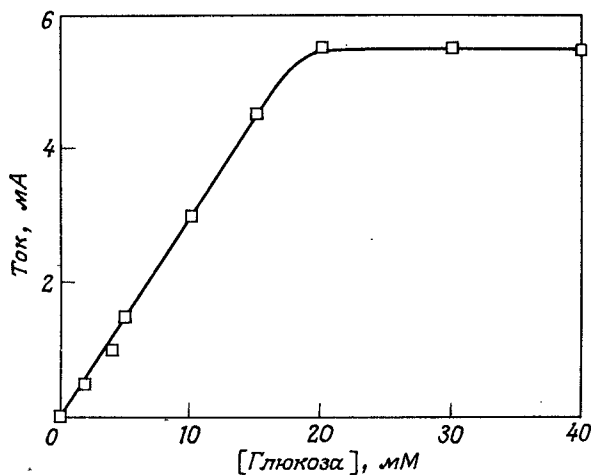


Рис. 16.6. Градуировочная кривая мембранного сенсора на основе глюкозооксидазы.

на позволила создать удобный прибор для проведения обычных анализов на глюкозу [9]. В качестве несущего электрода в данной системе приспособлена графитная фольга (фирмы Union Carbide, США) с большой удельной поверхностью, необходимой для иммобилизации компонентов. Углеродные диски диаметром 6,0 мм приклеивают по длине проволоки эпоксидной смолой с серебряным наполнителем (фирмы Johnson Matthey Chemicals, Великобритания). Затем их закрепляют на конце стеклянной трубки диаметром 6,0 мм с помощью непроводящей эпоксидной смолы (Ciba-Geigy Ltd., Великобритания). При этом следует обратить внимание на то, чтобы смола не попадала на кромки углеродных дисков, через которые обеспечивается доступ фермента. Уплотнение кромок приводит к потере до 75% тока, так как в этом случае фермент иммобилизуется преимущественно на поверхности электрода. После затвердевания смолы электрод переворачивают и изолируют снизу смесью 1,8 г эпоксидной смолы (марка 814) и 0,23 г отвердителя триэтилтетрамина (фирмы Polysciences Ltd., Великобритания). До затвердевания смеси электрод оставляют при комнатной температуре на ночь или, для ускорения сушки, нагревают током воздуха в печи при 60 °С в течение 1,5 ч. В собранном узле проверяют сопротивление между токоподводящей проволокой и поверхностью электрода, отбраковывая при этом электроды с сопротивлением больше 3,0 Ом. Электроды с более высоким или переменным сопротивлением не дают линейного и воспроизводимого сигнала. Далее в электроды вводят медиатор — 25 мкл 100 мМ раствора 1,1-диметилферроцена (фирмы Strem Chemicals, США), в подходящем растворителе, например толуоле, и сушат на воздухе. Иммобилизацию фермента проводят, вначале помещая графитовый электрод на 80 мин при комнатной температуре в ацетатный буферный раствор (100 мМ, рН 4,5), содержащий мето-*n*-толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодиимида (100 мМ). Затем электроды промывают дистиллированной водой и помещают на ночь в раствор глюкозооксидазы (50 мг/мл белка на 1 мл) в ацетатном буферном растворе (100 мМ, рН 4,5) или на час в карбонатный буферный раствор (100 мМ, рН 9,5) с тем же содержанием белка. После иммобилизации электроды промывают и хранят замороженными при -20 °С в фосфатном буферном растворе (100 мМ, рН 7,4).

При постоянном потенциале +150 мВ (относительно н.к.э.) и температуре 30 °С электродная функция линейна до концентрации глюкозы 30 мМ с постоянной времени 30 с [9]. При низких концентрациях глюкозы (до 8,0 мМ) сигнал сенсора не зависит от рН в диапазоне рН 7,0–9,0, хотя при высоких концентрациях глюкозы такая зависимость наблюдается. С ростом температуры до 45 °С ток электрода увеличивался со скоростью 4,0%/град, при более высокой температуре происходит инактивация. Присутствие кислорода вызывает уменьшение генерируемого тока, поскольку кислород является естественным акцептором электрона для используемого фермента. Кажущаяся константа Михаэлиса K_M для окисления глюкозы при помощи иммобилизованной этим способом глюкозооксидазы составляла 24 мМ. Поликарбонатная мембрана, помещенная на датчик, не влияет на значение K_M . Однако в случае диалитической мембраны K_M повышается до 74 мМ. При этом отклик системы из кинетически контролируемого становится диффузионно контролируемым, что можно использовать для расширения диапазона линейности.

К числу достоинств электрода по сравнению с описанными выше системами относится то, что он позволяет быстро и многократно проводить измерения в растворах исследуемых образцов. Электрод легко градуировать, а при работе с физиологическими концентрациями глюкозы его функция не зависит от рН, что так характерно для растворенного фермента. Итак, по многим своим характеристикам электрод удовлетворяет требованиям клинического анализа и анализов *in vitro*. Использование микроманипуляторной техники в сочетании с миниатюрными электродами, видимо, будет способствовать разработке приборов этого типа для анализов *in vivo*.

16.4. Плоские приборы

Для медиаторных амперометрических биосенсоров характерны довольно низкие токи, что позволяет упростить их электронную схему путем объединения электрода сравнения и вспомогательного электрода в один противозлектрод, в качестве которого можно, например, использовать хлоридсеребряный электрод сравнения. Двухэлектродная конфигурация позволяет монтировать рабочий и противозлектрод в непосредственной близости друг от друга на подходящем основании, что позволяет уменьшить требуемый объем пробы. Примером может служить плоский ферментный электрод, показанный на рис. 16.7. Хлоридсеребряный электрод из серебряной фольги (BDH Chemicals Ltd., Великобритания) полируют суспензией оксида алюминия (0,2 мкм; BDH Chemicals Ltd.). Как и в описанных выше приборах с задаваемым потенциалом, фольгу (размером $40 \times 5,0 \times 0,13$ мм) связывают с внешней цепью припаянной проволокой, изолированной с помощью непроводящей эпоксидной смолы (Ciba-Geigy, Великобритания). Перед использованием электрод погружают в раствор HCl (1,0 M), выдерживают 30 с при потенциале +400 мВ (относительно н.к.э.) и промывают дистиллированной водой. Перед установкой в плоский прибор одну поверхность электрода полируют суспензией оксида алюминия и разрезают на квадратики ($3,0 \times 3,0$ мм). Каждый такой квадратик приклеивают к основанию проводящей смолой с серебряным наполнителем (фирмы Johnson Matthey Chemicals).

Квадратики папиекса ($3,0 \times 3,0$ мм) прикрепляют к базовому электроду при помощи коллоидного графита. Плотно прижав папиекс к электроду, удаляют излишки графита. Фермент иммобилизуют так же, как описано выше. Перед этим электрод сравнения изолируют слоем силиконовой резины, чтобы исключить инактивацию фермента ионами серебра. Перед использованием глюкозооксидазного электрода протектор из силиконовой резины удаляют.

16.5. Производственные соображения

Амперометрические ферментные электроды уже сейчас вполне пригодны для использования в лабораторных условиях, хотя их разработка еще только выходит из начальной стадии и на практике могут возникать различные трудности. Они связаны прежде всего с необходимостью контроля химических и физических условий, влияющих на каталитические реакции в сенсоре. Мешающее влияние кислорода можно уменьшить, используя несамоокисляющиеся медиаторы. Еще более радикально эта проблема решается с помощью независимых от кислорода ферментов, например хинопро-

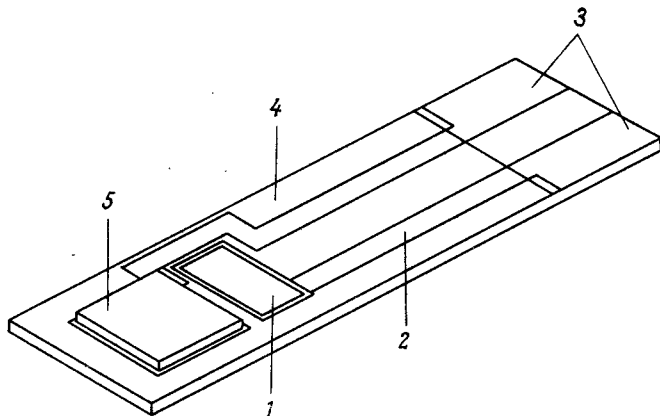


Рис. 16.7. Схематическое изображение плоского глюкозооксидазного электрода. Оба электрода, рабочий и хлоридсеребряный, установлены горизонтально на керамическом основании. Подробности см. в тексте. 1 - хлоридсеребряный электрод сравнения; 2 - соединительная проводящая дорожка; 3 - контакты для подключения потенциостата; 4 - изолирующий слой; 5 - ферментный электрод из графитовой фольги.

теинов. Влияние температуры и pH можно ослабить введением избытка фермента. Такая конфигурация сенсора позволяет преодолеть трудности, с которыми обычно сталкиваются при работе с другими рассмотренными выше вариантами амперометрических сенсоров. Однако она все же непригодна для массового производства. Для того, чтобы производство ферментных электродов было экономически оправдано и удовлетворяло коммерческим требованиям, должны выполняться некоторые условия, в том числе такие: компоненты должны быть доступны в достаточном количестве и необходимого качества и должны выпускаться при строгом соблюдении технологии [26].

Конструируя плоский прибор, необходимо найти возможность смонтировать оба электрода на одном основании в непосредственной близости друг от друга и связать их с внешней цепью. В качестве основания можно использовать множество материалов от керамики до пластмасс и даже картона. Выбрав подходящий материал для основания, следует найти способ нанесения низкоомных проводящих мостиков между концевым разъемом и электродами. Имеется множество вариантов решения этой проблемы прежде всего в зависимости от температуры, которую может выдержать материал основания [6]. Если керамика легко выдерживает температуру порядка 150 °С, то пластмассы при такой температуре уже деформируются. Два наиболее распространенных метода нанесения контактов при низких температурах включают химическое золочение [15] и напыление в вакууме [29]. Экспонируя соответствующие участки основания, на него можно нанести не только требуемый электрод, но и его разъем вместе с соединительной дорожкой, которую затем изолируют. Пористые угольные электроды можно изготавливать по непрерывной технологии с последующим выдерживанием в ваннах с реагентами. Стоимость электродов снижается, если можно ограничиться адсорбцией и исключить процедуру иммобилизации. Так, если при иммобилизации глюкозооксидазы на пористом угле не используется мето-*л*-толуолсульфонат 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил)карбодиимида, это приводит к уменьшению начального тока всего на 25%; следовательно, для нормального функционирования электродов достаточно простой абсорбции фермента.

Электроды сравнения можно изготовить по описанной выше методике, разрезать и прикрепить к основанию. Рабочие электроды иногда покрывают мембраной, изменяя тем самым время отклика и диапазон линейности электродной функции. Хотя имеются коммерческие мембраны, которые можно просто закреплять на основании, некоторые мембраны, например ацетилцеллюлозные, можно наносить набрызгиванием. Свойства таких мембран, естественно, зависят от используемого растворителя (или растворителей). Представленные ниже результаты показывают влияние мембраны и конфигурации электрода на линейность электродной функции. В случае топливного элемента и первого рассмотренного в этой главе сенсора без мембраны с задаваемым потенциалом электродная функция линейна вплоть до концентрации 0,45 мМ (рис. 16.3). Введение мембраны расширило диапазон линейности до 20 мМ (рис. 16.6).

Необходимо, чтобы собранные ферментные электроды при хранении до начала измерений были стабильными. Большинство ферментов можно хранить в замороженном виде в буферном растворе или охлажденными до 4 °С (фирма Yellow Springs Instruments, США) [30]. Более практично хранить электроды в сухом виде, как рекомендуют производители диагностических плоских сенсоров (фирма Ames Company Ltd., США). Сушить электроды можно продувкой воздухом или вымораживанием.

16.6. Заключение

За последние несколько лет наши знания в области электрохимических биосенсоров быстро углубляются. Это обусловлено взаимодействием биохимии, электрохимии

и электроники, а также экономическими стимулами. Имеются коммерческие разработки ферментных электродов для диагностических анализов, позволяющие проводить серийное определение некоторых метаболитов, например глюкозы, в клинических лабораториях. Описанные системы пригодны также для самоконтроля пациентов — путем визуального сравнения с цветной шкалой или, для большей точности, с использованием рефлектометра. Преимущества амперометрических систем перед существующими методами заключаются в возможности количественного определения отдельного метаболита, причем независимо от давления кислорода, без предварительной обработки пробы или промывки электрода перед использованием. В принципе электроды должны быть стабильными как при хранении, так и в эксплуатации и давать воспроизводимый в определенных рамках сигнал. Кроме того, они не должны быть подвержены мешающему влиянию других метаболитов. Способность амперометрических сенсоров работать в мутных растворах, например в крови, позволяет применять их и в других областях, например для анализа промышленных образцов и объектов окружающей среды.

Благодарность

Автор хотел бы выразить благодарность своим коллегам — сотрудникам фирмы Genetics International Inc. и особенно доктору Д. Скотту.

ЛИТЕРАТУРА

1. Adams R. M. *Electrochemistry at solid electrodes* (ed. A. J. Bard). Marcel Dekker, New York, 1969.
2. Aston W. J., Turner A. P. F. Biosensors and biofuel cells. In *Biotechnology and genetic engineering reviews* (ed. G. E. Russel), Vol. 1, pp. 89–120. Intercept. Newcastle upon Tyne, 1984.
3. Aston W. J., Ashby R. E. A., Scott L. D., Higgins I. J., Turner A. P. F. Enzyme based methanol sensor. In *Change and field effects in biosystems* (eds. M. J. Allen, P. N. R. Usherwood), pp. 491–8. Abacus Press, Tunbridge Wells, 1984.
4. Benetto H. P. Microbial fuel cells. *Life Chemistry Reports*, **2**, 363–453 (1984).
5. Birch K., Hilderbrandt P., Marshall M. O., Sestoff L. Selfmonitoring of blood glucose without a meter. *Diabetes Care*, **4**, 414–16 (1981).
6. Bunshah R. F., Blocher J. M., Bomfield T. D., Fish J. C., Ghate P. B., Jacobson B. E., Mattox D. M., McGurie G. E., Schwartz M., Thomson J. A., Tucker R. C. *Deposition technologies for films and coatings, development and applications*. Naves Publications, New Jersey, 1982.
7. Carr P. W., Bowers L. D. *Immobilised enzymes*. Analytical clinical chemistry. John Wiley, New York, 1980.
8. Cass A. E. G., Davis G., Green M. J., Hill H. A. O. Ferricinium as an electron acceptor for oxidoreductases. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **190**, 117–9, 1985.
9. Cass A. E. G., Francis G. D., Hill H. A. O., Aston W. J., Higgins I. J., Plotkin E. V., Scott L. D. L., Turner A. P. F. Ferrocene-mediated enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.*, **56**, 667–71, 1984.
10. Chiasson J. L., Morrisaet R., Hamet P. Precision and costs of techniques for self-monitoring of serum glucose levels. *Canadian Medical Research Association Journal*, **130**, 38–43, 1984.
11. Davis G., Hill H. A. O., Aston W. J., Turner A. P. F., Higgins I. J. Bioelectrochemical fuel cell and sensor based on a quinoprotein. *Enzyme and Microbial Technology*, **5**, 383–8, 1983.
12. D'Costa E. J., Duine J. A., Dokter P., Turner A. P. F., Higgins I. J. Kinetics of a microbial quinoprotein glucose dehydrogenase. *Society for General Microbiology Quarterly*, **11**, M11, 1984.
13. Dietzler D. N., Smith C. H. Carbohydrates. In *Gradwolls clinical laboratory methods and diagnosis* (eds. A. C. Sonnenwirth and L. Jareft), Vol. 1, pp. 210–49. C. D. Mosby, St. Louis, 1980.
14. Duine J. A., Frank J. Quinoproteins: a novel class of dehydrogenases. *Trends in Biochemical Science*, **6**, 278–80 (1981).
15. Feldstein N. Electroless plating in the electronics industry. *Plating* 141–53, 1984.
16. Guidotti G., Colombo J. P., Foa P. P. Enzymic determination of glucose. *Anal. Chem.*, **33**, 151–2 (1961).
17. Higgins I. J., Aston W. J., Best D. J., Turner A. P. F., Jezequel S. G., Hill H. A. O. Applied aspects of methylotrophy: Biochemical applications, purification of methanol dehydrogenase, mechanism of methane monooxygenase. In *Microbial growth on C1 compounds* (eds. R. L. Crawford, R. S. Hanson). American Society for Microbiology, Washington, 1984.

18. Lowe C., Goldfinch M.J., Lias R.T. Some novel biomedical biosensors. In Biotech 83, pp. 665-78. Proceedings of the International Conference on the Commercial Applications and Implications of Biotechnology. Online Publications, Northwood, London, 1983.
19. Mosbach K., Danielsson B. Enzyme thermister devices. Anal. Chem., **53**, 83-94 (1981).
20. Neese J.W., Duncan P., Bayse D., Robinson M., Cooper T., Stewart C. Development and evaluation of a Hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase procedure for use as a National Reference Method. U.S. Department of Health, Education and Welfare. US Public Health Service Center for Disease control, Atlanta, GA. HEW Publication Number (CDC) 77-8330, 1976, 147 pp.
21. Passey R.B., Gillum R.L., Fuller J.B., Urry F.M., Giles M.L. Evaluation and comparison of 10 glucose methods and the reference method recommended in the proposed product class standard (1974). Clinical Chemistry, **23**, 131-9 (1977).
22. Plotkin E.V., Higgins I.J., Hill H.A.O. Methanol dehydrogenase bioelectrochemical cell and alcohol detector. Biotechnology Lett., **3**, 187-92 (1981).
23. Preneta A.P., Turner A.P.F., Higgins I.J. Enzyme-based lactate sensor. Society for General Microbiology Quarterly, **11**, M11 (1984).
24. Sawyer D., Roberts J. Experimental electrochemistry for chemists, pp. 67-79. Wiley, New York, 1974.
25. Scott D., Brannan J., Higgins I.J. The effect of growth conditions on intracytoplasmic membranes and methane mono-oxygenase activities in *Methylosinus trichosporium* OB3b. J. of General Microbiology, **125**, 63-72 (1981).
26. Sharp J.R. Guide to good pharmaceutical manufacturing practice. HMSO publications. Grovenor Press, Portsmouth, 1983.
27. Shaw M. Biochemical fuel cells. In Proceedings of the 17th Annual Power Sources Conference. **1**, 53-6, 1963.
28. Sherwood M.J., Warchal M.E., Chen S.-T. A new reagent strip (Visidex) for determination of glucose in whole blood. Clinical Chemistry, **29**, 438-46 (1983).
29. Siltzer I.A. An ultramicro glucose electrode. In Ion and electrode in biology and medicine (eds. M. Kessler, L. C. Clark, D. Lubbers, I.A. Silver, W. Simon), pp. 189-92. Urban and Schwarzenberg, Munich, Berlin, 1976.
30. Smith H.R. Vacuum deposition techniques, methods of aluminium evaporation. Metal Finishing Sept., 42-47 (1976).
31. Thai A.C., Yeo P.P.B. Stable blood glucose test strips and reflectance meters. Singapore Medical Journal, **24**, 45-7 (1983).
32. Turner A.P.F., Aston W.J., Higgins I.J., Davis G., Hill H.A.O. Applied aspects of bioelectrochemistry: Fuel cells, sensors and bioorganic synthesis. Biotechnology bioengineering Symposium, **12**, 401-12 (1980).
33. Turner A.P.F., Bell J.M., Colby J., Davis G., Hill H.A.O. Carbon monoxide: Acceptor oxidoreductase from *Pseudomonas thermocarboxydvorans* strain C2 and its use in a carbon monoxide sensor. Anal. Chim. Acta, **163**, 161-74 (1984).
34. Walter B. Dry reagent chemistry in clinical chemistry. Anal. Chem., **55**, 499a-514a (1983).

Редокс-медиаторные электрохимические процессы с участием цельных микроорганизмов: от топливных элементов к биосенсорам

Х. П. Бенетто, Дж. Бокс, Дж. М. Деланей, Дж. Р. Мейсон, С. Д. Роллер, Дж. Л. Стирлинг, К. Ф. Тэрстон

17.1. Введение

17.1.1. Сенсоры с «прямым» и «косвенным» использованием микроорганизмов

До недавнего времени цельные микроорганизмы использовали лишь в биосенсорах «косвенного» действия, в которых их биокаталитические свойства сочетались с простыми и хорошо известными чувствительными элементами, такими как рН-электрод (в случае индуцируемого субстратом образования кислых или щелочных продуктов) или обычный кислородный электрод (при субстрат-зависимом дыхании). Общее представление о применении этих приборов дают написанная Карубе глава 2 настоящей книги и обзоры [2, 23, 36]. Особое внимание, в частности, уделяется возможностям их использования в клиническом анализе биологических жидкостей, для контроля за ферментационными системами, в токсикологических исследованиях и для определения антибиотиков [17, 21, 32, 47].

В данной главе мы рассматриваем иной подход, основанный на недавних исследованиях микробных топливных элементов, в которых микроорганизмы «непосредственно» дают электрический сигнал. Биохимический топливный элемент, содержащий клетки или клеточные компоненты, давно привлекает внимание как источник «альтернативной энергии» (из биологических топлив) [2, 4], а в последнее время и как возможный путь синтеза соединений, представляющих коммерческий интерес [51]. В 60-х и 70-х годах интенсивно изучались различные типы биотопливных элементов, что стимулировалось финансируемыми НАСА исследовательскими программами, целью которых было создание вспомогательных источников энергии. Однако в большинстве этих приборов энергия получалась за счет электрохимического окисления вторичных продуктов метаболизма, таких как формиат или водород, и эффективность их была довольно низкой. Тем не менее выделение водорода *Clostridium butyricum* остроумно использовали в первых микробных сенсорах – топливных элементах для определения БПК (биологическое потребление кислорода) в сточных водах [31] и для оценки содержания муравьиной кислоты [37].

Недавнее возрождение интереса к микробным топливным элементам и сенсорам связано с открытием, что при помощи сопрягающих редокс-реакций можно установить прямую и эффективную связь между процессами на электроде и дыханием микробов. В таком «прямом» микробном топливном элементе источником энергии является хорошо изученная способность микроорганизмов восстанавливать «редокс»-активные вещества, образующиеся на начальных или промежуточных стадиях катаболизма. При этом электроны из богатых ими внутриклеточных веществ могут выводиться из нормальных дыхательных цепей посредством соответствующих сопрягающих реакций и через анод попадать во внешнюю цепь [8, 9]. С некоторыми конструктивными изменениями топливный элемент можно приспособить для использования в качестве сенсора, поскольку поток электронов, возникающий при электрохимическом окислении, легко измерить амперометрически или другими методами, а в определенных

условиях сигнал такой системы становится субстрат-зависимым [50]. Существенное различие между «прямым» и «косвенным» режимом работы сенсорного топливного элемента заключается в том, что в косвенном режиме сигнал определяется нернстовской зависимостью потенциала электрода от концентрации стабильных продуктов метаболизма или полярографической волной кислорода, тогда как в «прямом» режиме между субстратом и электродом действительно устанавливается биоэлектрохимическая связь через активные продукты биокаталитических реакций.

Далее мы остановимся вкратце на биоэлектрохимических основах медиаторных сенсоров, которые на основе целых клеток с электродами используют промежуточные редокс-реакции, и попытаемся обрисовать основные моменты, на которые следует обращать внимание при конструировании таких приборов. Для иллюстрации этих принципов ниже приведены предварительные данные по глюкозным и спиртовым сенсорам.

17.1.2. Перенос электронов в ферментных и клеточных системах

Между механизмами генерации сигнала целыми клетками и в медиаторных ферментных электродах (последние обсуждаются в гл. 12 и 15 настоящей книги) имеются принципиальные различия. В последнем случае электроны отбираются от восстановленных ферментов на донорном сайте (или ограниченном числе сайтов) при условии относительно свободного доступа к медиатору. Доступ медиатора к восстановителям в организме естественно ограничивается клеточными стенками и мембранами, к тому же число и расположение восстанавливающих частиц (ферменты, пиридинозные нуклеотиды, хиноидные интермедиаты, цитохромы) могут меняться. В принципе медиатор может взаимодействовать с каким-то специфическим внутриклеточным донором электрона, но поскольку в системе присутствуют сложные взаимодействующие редокс-частицы, во многих случаях удобно считать, что электроны образуют своего рода «восстановительный пул» в цитоплазме. Некоторые из факторов, которые следует учитывать в этих системах, имеют также непосредственное отношение к сенсорным приложениям электрохимии белков и переносу электронов на цитохромные центры и из них, рассмотренным в недавних обзорах [13, 50].

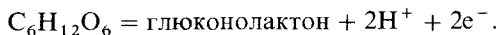
17.2. Клетки как катализаторы в биосенсорах

Поскольку большинство ферментов, применяемых в биосенсорах, выделяют из микроорганизмов, вполне логично рассматривать и сами микроорганизмы как потенциальные биокатализаторы, даже если манипулирование с ними создает ряд проблем [2]. Для использования в сенсорах микроорганизмы можно направленно отбирать из доступного нам огромного их числа (аэробные, анаэробные, хемолитотрофные, фотосинтетические микроорганизмы и т. д.), поскольку они сильно различаются по физиологии дыхания и своей биохимии. Четких руководств по выбору таких микроорганизмов не имеется. Здесь приходится пользоваться тем, что известно о приложениях ферментов, и опытом многочисленных более ранних исследований по непрямым микробным сенсорам. Направления будущей работы с микроорганизмами во многом определяются рядом отчетливых достоинств и недостатков микроорганизмов как биокатализаторов:

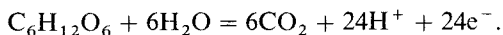
а) Изменчивость микроорганизмов очень велика, и в принципе они могут служить биокатализаторами для широкого круга представляющих аналитический интерес субстратов. Этот круг охватывает почти все типы природных соединений углерода [24].

б) Стоимость производства многих микроорганизмов не слишком велика, тогда как выделение фермента из его источника может обходиться дорого.

в) В тех случаях, когда окисление в клетках включает несколько стадий разложения субстрата с образованием восстанавливающихся интермедиатов, электрохимический сигнал целых клеток может быть выше, чем в случае изолированного фермента. Так, в одном из типов глюкозного сенсора при окислении глюкозы в глюконолактон с помощью глюкозооксидазы выделяется два электрона на молекулу субстрата [14]:



В то же время полное окисление глюкозы в живой клетке можно представить уравнением



На практике можно добиться почти такого же большого выхода электронов [18]. Следует, однако, отметить, что микробные катализаторы имеют больший объем, чем ферментные, и по оценкам в биотопливных элементах относительная активность клеток некоторой заданной массы примерно равна активности той же массы фермента, которая содержится в этих клетках.

г) Некоторые потенциально пригодные для биосенсоров ферменты неустойчивы или требуют для своего функционирования либо гидрофобного окружения, либо сложных методов иммобилизации. В микроорганизмах устойчивость и активность ферментов обеспечивается естественной внутриклеточной средой, которую трудно имитировать, а способы иммобилизации клеток довольно просты [23, 29].

д) В микроорганизмах ферменты лучше защищены от мешающих (генерирующих сигнал) или ингибирующих растворенных веществ, например соединений тяжелых металлов, имеющих во многих исследуемых образцах.

е) Для ферментативного биоэлектрохимического переноса электронов часто необходимы коферменты. Однако при использовании микроорганизмов не требуется вводить экзогенные кофакторы, поскольку эти вещества регенерируются в клетках.

ж) Многие микроорганизмы подробно охарактеризованы генетически, а методы селекции штаммов с высоким выходом определенных ферментов достаточно отработаны. Разумное использование мутаций позволяет дополнительно увеличить активность, селективность и специфичность биосенсоров.

з) Как прямые, так и косвенные методы преобразования сигнала целых клеток открывают простор для негенетических биотехнологических манипуляций. В частности, прямой метод гарантирует универсальность преобразования электронов на различных промежуточных стадиях окислительного процесса, возможно, с некоторой селективностью, обуславливаемой различиями в отклике системы на различные медиаторы (разд. 17.3). В косвенном методе образование дающих сигнал активных продуктов в многостадийном окислительном процессе почти наверняка подвержено кинетическому ингибированию, тогда как в прямом методе преобразование электронов обычно минует большую часть дыхательной цепи.

Однако, кроме преимуществ использования микроорганизмов в сенсорах, есть и недостатки, к которым, в частности, можно отнести следующие:

а) Высокая приспособляемость и изменчивость микроорганизмов могут, с другой стороны, снижать селективность и чувствительность микробных сенсоров, поскольку может окисляться не только подлежащий определению субстрат. Эта проблема особенно остра при анализе биологических жидкостей с высокой концентрацией активных веществ, таких как глюкоза. Кроме того, клетки, лишённые какого-либо субстрата, могут «переключаться» на альтернативный путь метаболизма.

б) Проблемой является и биологическая устойчивость, что связано с необходимостью длительного хранения и поддержания активности микроорганизмов в течение длительного времени. Как ни странно, о долговременной устойчивости ферментов и клеток известно очень мало.

в) В восстановительных реакциях микроорганизмов «включению» дыхательного процесса с помощью медиаторов может мешать атмосферный кислород.

г) Определенные трудности связаны с необходимостью предотвращать потери растворимых медиаторов путем иммобилизации или какими-либо другими методами.

Проводимые в настоящее время исследования показывают возможность конструирования сенсоров на основе как грам-положительных, так и грам-отрицательных микроорганизмов, причем либо строго аэробных, либо факультативно анаэробных (см. табл. 17.1). Некоторые описанные выше преимущества и недостатки микроорганизмов

Таблица 17.1. Микробные сенсоры, построенные по принципу биотопливного элемента: используемые или исследуемые микроорганизмы

Микроорганизмы	Субстрат	Литература ^a
<i>Clostridium butyricum</i>	БПК ^{б,в}	[31]
<i>Clostridium butyricum</i>	Муравьиная кислота ^б	[37]
<i>E. coli</i>	Глюкоза	[25]
<i>E. coli</i> ML308	Лактоза	[43]
<i>Proteus vulgaris</i>	Глюкоза, сахароза	
<i>Anabaena variabilis</i>	CO ₂ , <i>hν</i>	[4]
<i>Methylomonas methylovora</i>	Этанол, метанол	[11]
<i>Alecaligenes eutrophus</i>	Сукцинат, пируват	
<i>Pseudomonas putida</i>	Сукцинат	
<i>Erwinia carotovora</i>	Сахароза	
<i>Nocardia salmonicolor</i>	Ацетат-ион	
<i>Hansenula anomala</i>	D,L-Лактат	[45]
<i>Lactobacillus fermenti</i>	Витамин В ₁	[45]

^a Опубликованные работы и неопубликованные результаты.

^б БПК - биологическое потребление кислорода.

^в Топливный элемент «косвенного» действия на основе биологического производства водорода (без медиатора).

как биокатализаторов обнаружили в результате наших недавних экспериментов, часть из которых подробно рассмотрена в разделе 17.4, а в разделе 17.5 обсуждаются возможные способы усовершенствования биосенсоров.

17.3. Генерирование электрического тока микроорганизмами

17.3.1. Микробные топливные элементы

Изучение биохимических топливных элементов показало, что перенос электронов от микроорганизмов довольно эффективен, если анолит содержит подходящий редокс-медиатор [8, 9]. Достижения в разработке биотопливных элементов прямого действия обсуждаются в обзорных работах [2, 4, 56]. Многие исследования этого рода проводились с целью установить, какие именно факторы в общем случае определяют генерацию электричества микробами. В особенности это касалось решающей роли редокс-медиаторов в индуцированном переносе электронов через клеточные стенки и мембраны [18, 42], но были также созданы и предпосылки для разработки биоанодного сенсора [50]. Отметим также, что для измерения бактериальной активности в продуктах питания и молоке давно используют скорость обесцвечивания редокс-красителей, например резазурина [41], а отсюда недалеко до сопряжения реакций этого типа с электрохимическим или оптическим сенсором.

Принцип работы микробного топливного элемента иллюстрируется рис. 17.1, а на рис. 17.2 приведена типичная разрядная характеристика при последовательном добав-

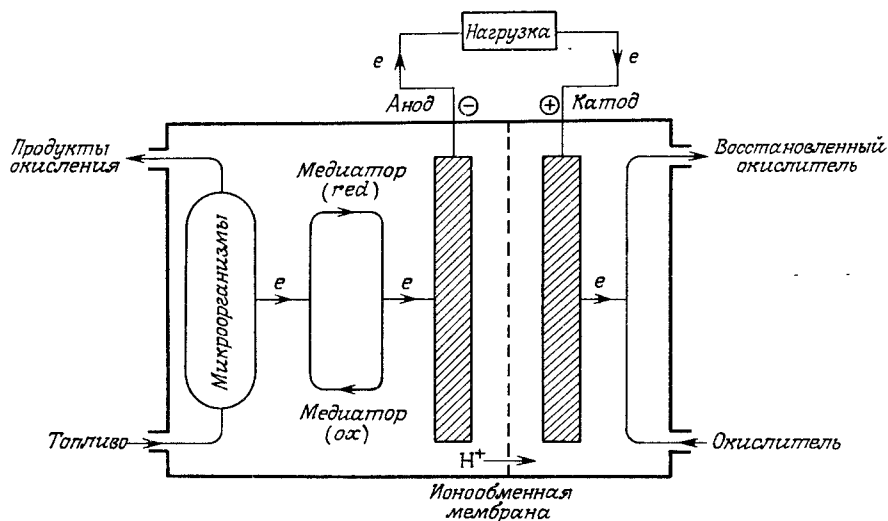


Рис. 17.1. Схема микробного топливного элемента (детальное описание см. [4, 18]).

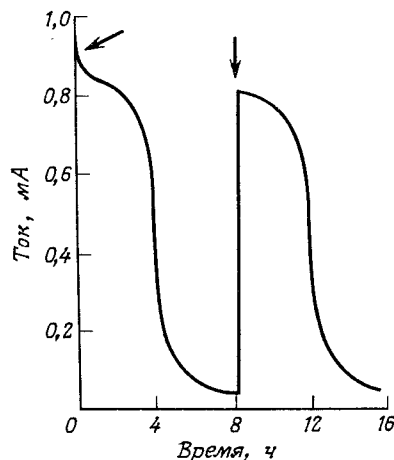


Рис. 17.2. Генерирование электричества микробным топливным элементом на основе системы глюкоза/*P. vulgaris*. Состав анолита: 0,1 М фосфатный буферный раствор (рН 7,0); 1 мМ тионин; 30 мг (сухой вес) микроорганизмов. Температура 30°C. Ячейку разряжали на нагрузке 560 Ом. Стрелками отмечены моменты введения 10 мкмоль глюкозы.

лении субстрата, полученная при помощи глюкозного элемента, содержащего *P. vulgaris* и в качестве медиатора тионин. Суммарный заряд, прошедший через элемент (его можно найти по площади под кривой), пропорционален количеству добавленного субстрата. Проведенный недавно детальный анализ этой системы позволил оценить, как расходуется глюкоза в анодном отделении. Оказалось, что кулонометрический выход при окислении глюкозы составляет около 50% [49]. Эти результаты были получены при помощи элемента, содержащего 30 мг свободно суспендированных бактерий. Такой элемент способен генерировать сигнал в миллиамперном диапазоне при измерении тока или в сотни милливольт при измерении напряжения. При добавлении субстрата мощность элемента быстро восстанавливается (рис. 17.2). Для аналитических целей такой прибор, однако, слишком велик (объем анодного отделения 15 см³) и обладает довольно большим временем отклика (несколько минут). Чтобы

этот сенсор был удобен для работы, необходимо значительно изменить его размеры и конфигурацию. Эти вопросы рассматриваются в разделе 17.5.

17.3.2. Взаимодействие медиаторов с микроорганизмами

Работы по топливным элементам дали много информации, необходимой для разработки сенсоров на основе микроорганизмов. Эффективность преобразования сигнала зависит от скорости восстановления медиатора, которая существенно различается для разных типов микроорганизмов и медиаторов. Это иллюстрирует приведенная в табл. 17.2 выборка данных из последних работ [42, 48]. Независимо от

Таблица 17.2. Скорость восстановления медиаторов микроорганизмами, мкмоль $\text{г}^{-1}\text{с}^{-1}$ (субстрат – глюкоза, 30°C)

Микроорганизм	Q_{O_2}	T	МГ	БКС	БВ
<i>E. coli</i> В/г	1,76	3,65	4,16	0,99	2,23
<i>P. vulgaris</i>	0,69	7,10	1,70	1,03	6,11
<i>P. aeruginosa</i>	1,03	1,54	—	0,63	0,31

Примечание: Т – тионин; МГ – метиленовый голубой; БКС – бриллиантовый крезоловый синий; БВ – бензилвиологен; Q_{O_2} – дыхательный коэффициент, или скорость восстановления молекулярного кислорода (необходимо отметить, что в процессах восстановления O_2 , Т, МГ, БКС и БВ участвуют 4, 2, 2, 2 и 1 электрон соответственно).

причины такие различия в реакционной способности медиаторов можно было бы использовать для различения типов микроорганизмов и отдельного определения и подсчета клеток. Скорость восстановления в рассматриваемых системах обычно зависит от концентраций микроорганизмов, медиатора (до известных пределов) и субстрата (в зависимости от условий загрузки). Для данного микроорганизма и медиатора она вполне воспроизводима и обнаруживает лишь небольшие колебания (до 20%) в зависимости от скорости роста микроорганизма.

Вопрос о том, какой тип молекул медиатора или какое его свойство обеспечивает быстрый перенос электрона в системах с интактными микроорганизмами, относится к числу трудноразрешимых. Не существует простой зависимости от заряда медиатора, однако его липофильность может играть важную роль, способствуя проникновению в липидные мембраны [7]. Другие факторы подробно рассмотрены в работе [4]. Достижимые редокс-уровни в системе, видимо, варьируют для различных микроорганизмов и медиаторов, но соотносить их со специфическими восстановительными центрами трудно. Попытки точной локализации восстановителя, возможно, не имеют смысла, поскольку частицы, непосредственно взаимодействующие с медиатором, необязательно являются основным источником электронов, а концентрации и окислительно-восстановительные состояния внутриклеточных промежуточных соединений и медиатора могут оказаться взаимосвязанными. Некоторое представление о механизме взаимодействия клеток с медиатором можно получить, анализируя кинетику восстановления различных медиаторов. Примером может быть восстановление тионина и 2-гидрокси-1,4-нафтохинона (HNQ). Оба эти вещества являются эффективными медиаторами для живых клеток [5]. В буферном растворе тионин исключительно быстро (на несколько порядков быстрее, чем многие его производные) реагирует со свободным NADH; напротив, HNQ в этих условиях вообще не реагирует со свободным NADH. Это показывает, что сам по себе NADH не может восстанавливать HNQ в клетке, следовательно, поставщиком электронов должен быть какой-то другой

интермедиат. Интересно, что HNQ восстанавливается NADH в присутствии мембранных частиц [11].

Использованию многих медиаторов в сенсорах препятствует их низкая долговременная устойчивость, особенно в восстановленной форме. Следует также отметить, что многие требования к медиаторам, используемым в биотопливных элементах, отличаются от требований, предъявляемых к медиаторам для сенсоров, где необходим определенный компромисс. В случае растворимых медиаторов возникают трудности, связанные с их потерей, тогда как нерастворимые медиаторы дают диффузионно ограниченные токи. Влияние солюбилизирующих групп проявляется сложно: положительно заряженные группы способствуют миграции восстановленного медиатора к аноду, но заодно и облегчают нежелательную адсорбцию на нем (как в случае тионина); группы с отрицательным зарядом ингибируют проникновение медиатора через отрицательно заряженные клеточные стенки и его перенос к катоду (отрицательному электроду), хотя в случае аниона HNQ это не очевидно. В последнее время внимание исследователей сосредоточено на использовании в качестве медиатора ферроцена и его производных, главным образом из-за того, что растворимость и электрохимические свойства этих соединений можно изменять в желательном направлении с помощью заместителей. Нерастворимые ферроцены применяли при конструировании ферментного глюкозного сенсора [14], хотя остаются некоторые неясности в механизме действия этих медиаторов. Так, особое внимание уделяется диффузии катиона окисленного ферроцена от электрода, однако не понятно, каким образом нерастворимая нейтральная форма медиатора переносит электроны к электроду после восстановления катиона ферментом.

17.3.3. Электрохимические аспекты

17.3.3.1. Принцип действия микробных сенсоров. Сенсоры непосредственного действия, работающие в амперометрическом режиме, имеют явные преимущества перед аналогичными потенциометрическими сенсорами. Работоспособность сенсора, естественно, зависит от скорости установления равновесного стационарного потенциала и тока электрода в присутствии медиатора. При введении субстрата генерация электронов микроорганизмами приводит к увеличению концентрации восстановленного медиатора (и, следовательно, изменению редокс-соотношения), что в свою очередь вызывает сдвиг потенциала и прохождение тока через внешнюю нагрузку. При соответствующем выборе сопротивления нагрузки и концентрации компонентов амперометрический сигнал можно измерять в стационарных условиях, а деполяризующее действие микроорганизма становится субстрат-зависимым. Пределы чувствительности, точность и время отклика такого сенсора будут определяться величиной тока, получаемого при данных количествах клеток микроорганизма и субстрата. Кроме рассмотренных биологических факторов ток сенсора будет зависеть от эффективности реакции переноса электрона на каждом конце процесса: а) переноса электронов от его источника в микроорганизме к медиатору; б) переноса электронов от медиатора к базовому электроду. На обе эти реакции влияют ограничения, связанные с электрохимической активацией и массопереносом. Они могут приводить к значительной поляризации и низкой эффективности работы элемента.

17.3.3.2. Поляризационные эффекты. Рассмотрим вначале процесс восстановления (раздел 17.3.3.1, а). Важным условием быстрого установления потенциала является быстрое проникновение медиатора в клетку и из нее, как и в случае микробного топливного элемента. Если быстрое проникновение не обеспечивается, одна из этих стадий может стать скоростьюопределяющей, и сенсор будет давать отклик весьма медленно. (В неблагоприятных случаях, когда оболочка клетки менее проницаема,

сенсор можно несколько улучшить, используя более сложные медиаторные системы; см. раздел 17.5). Поскольку скорость проникновения медиатора зависит от концентрации, имеет смысл поддерживать потенциал системы постоянным с помощью потенциостата (как показано в приведенном ниже примере) так, чтобы концентрации восстановленной или окисленной формы медиатора не становились слишком малыми, а редокс-отношение не приближалось к предельным значениям. Измеряемый ток также не должен быть настолько большим, чтобы выводить избыточные количества медиатора из реакционной зоны, поскольку это может вызывать нежелательный эффект концентрационной поляризации.

Предположим, например, что создан сенсор, в котором используется 1 мг (сухой вес) микроорганизмов и 0,1 мл 1 мМ раствора медиатора (одноэлектронного окислительно-восстановительного агента). Таким образом, система содержит 10^{-7} моль медиатора, и с учетом числа Фарадея $F = 10^5$ Кл/моль для полного восстановления медиатора требуется количество электричества 10^{-2} Кл. Эксперименты показывают, что в присутствии медиатора многие активные микроорганизмы способны поддерживать токи до 100 мкА/мг, что эквивалентно 10^{-4} Кл/с, и, таким образом, они сравнительно слабо влияют на концентрацию медиатора. В такой системе субстрат (например, глюкоза) удаляется из анализируемого раствора со скоростью порядка 10 нмоль/с, так что при времени измерения, скажем 0,5–5 мин, анализ является по существу неразрушающим.

Изучение проницаемости липидных мембран клеток показывает, что ни вход, ни выход медиатора в равной мере не должны быть лимитирующими процессами при миллимолярных его концентрациях [4]. На практике в благоприятных случаях быстрое восстановление медиатора само по себе приводит к быстрому отклику чувствительного элемента сенсора. В топливных элементах наблюдаемое время отклика обычно составляет 0,5–5 мин, причем оно может быть значительно сокращено в устройствах, в которых медиатор локализован на поверхности электрода или вблизи нее. В таких электродах скоростьопределяющей стадией может быть поглощение субстрата микроорганизмами, которое часто протекает очень быстро и не представляет проблемы. Интересно отметить, что в топливном элементе поглощение глюкозы клетками *P. vulgaris* ускоряется, когда элемент находится под нагрузкой [49].

Чтобы оценить значение стадии переноса электрона (разд. 17.3.3.1, б), целесообразно воспользоваться предыдущим примером, выразив ток с помощью обычного уравнения для скорости электрохимического процесса:

$$i = FkcA,$$

где c – концентрация восстановленной формы медиатора, переносящего заряд на электрод; A – площадь рабочего электрода (обычно принимаемая равной 1 см^2); k – константа скорости электрохимической реакции. Методом циклической вольтамперометрии показано, что для нескольких эффективных медиаторов k составляет 10^{-2} – 10^{-3} см/с. Подставляя эти значения в приведенное выше уравнение, находим, что при концентрации 1,0 мМ ток может поддерживаться на уровне 0,1–1,0 мА и, следовательно, поляризацией электрода можно пренебречь.

Для сравнения уместно отметить, что во многих сенсорах косвенного действия, где существует зависимость от давления кислорода или концентрации продукта, равновесие устанавливается медленно, и процессы на электроде протекают вяло. Это, в частности, обусловлено диффузионными ограничениями. Зависимость от потребления кислорода является общим недостатком многих систем, содержащих популяции аэробных микроорганизмов с высокой плотностью. Давление кислорода в них может стать исчезающе малым, а его перенос сильно замедлиться [16]. Следовательно, необходимо различать методы с использованием кислородного электрода, которые по

существу являются полярографическими, и амперометрические методы с редокс-медиаторами, для которых это неверно.

17.3.3.3. Электродные потенциалы медиаторов. В микробных топливных элементах выгодно использовать медиаторы с низким окислительно-восстановительным потенциалом, чтобы получить максимальное напряжение. Для сенсоров это, однако, не играет роли при условии адекватности сигнала. Здесь заслуживают внимания медиаторы с более высоким E^0 , которые обычно более стабильны и менее склонны к реокислению молекулярным кислородом. Мешающее влияние кислорода, однако, уменьшается, если кинетика процессов взаимодействия медиатор-микроорганизм и медиатор-электрод такова, что способствует быстрому переносу электронов.

17.3.3.4. Электродные материалы. В настоящее время имеются данные о том, что углеродные электроды можно успешно использовать в сочетании с биокатализатором. Эти электроды обладают подходящими электрохимическими свойствами [10, 52], а модифицируя их поверхность путем контролируемого окисления, можно получить на ней группы, идеальные для образования связующих мостиков с цельными микроорганизмами (см. раздел 17.5).

17.4. Экспериментальные устройства с цельными клетками

Проиллюстрируем применение биотопливных элементов прямого действия для получения электрических сигналов, пропорциональных концентрации субстрата, примерами с глюкозой и этанолом. При этом рассмотрим два субстрат-зависимых параметра: 1) общий кулонометрический сигнал ячейки при постоянной нагрузке; 2) скорость нарастания тока (или потенциала).

Определенную ценность при исследовании представляют также ток пика, потенциометрический, потенциостатический, импедансный и емкостный сигналы. На рис. 17.3 показана линейная зависимость кулонометрического выходного сигнала от концентрации глюкозы для сенсора на основе *P. vulgaris*, аналогичная приведенной на рис. 17.2. На рис. 17.4 изображена концентрационная зависимость скорости нарастания тока для того же элемента с HNQ в качестве медиатора и постоянным анодным потенциалом, который поддерживается активной нагрузкой.

На рис. 17.5 показано изменение во времени тока топливного элемента на основе *Methylomonas methylivosa* при последовательных добавках этанола. В этих экспери-

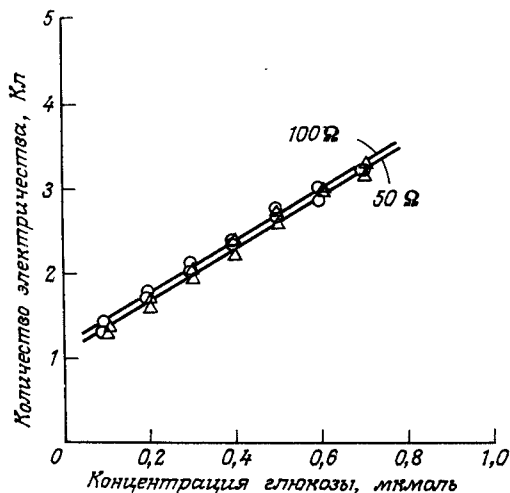


Рис. 17.3. Корреляция между электрическим сигналом и концентрацией глюкозы для сенсора на основе топливного элемента с *P. vulgaris*. Условия: 60 мг (сухой вес) микроорганизмов; сопротивление нагрузки 100 (○) и 50 Ом (△); 30°C.

Рис. 17.4. Скорость увеличения тока в зависимости от концентрации глюкозы для топливного элемента-сенсора на основе *P. vulgaris*. Условия: 8 мМ 2-гидрокси-1,4-нафтахинон; 50 мг (сухой вес) микроорганизмов; 30°С. Сопротивление нагрузки автоматически подбиралось таким, чтобы напряжение оставалось постоянным и равным 0,53 В.

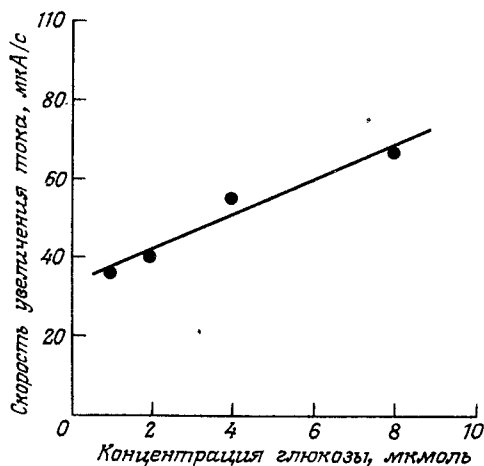


Рис. 17.5. Изменение во времени тока топливного элемента на основе *Methylomonas methylovora*. Условия: 1 мМ тионин; 60 мг (сухой вес) микроорганизмов; 560 Ом. В точках I, II, III, IV добавлено 0,5; 1,0; 1,5 и 2,0 мкмоль этанола соответственно.

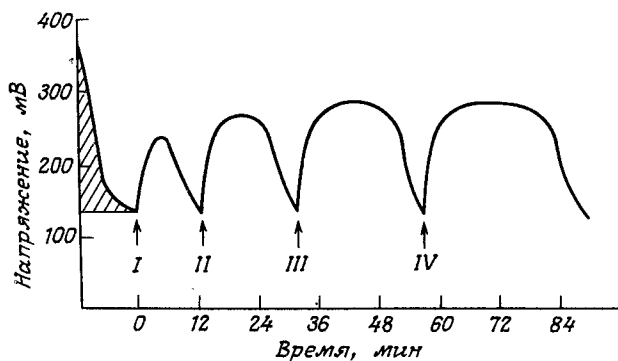
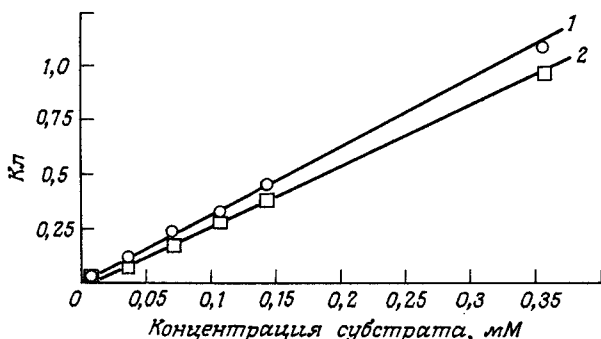


Рис. 17.6. Кулонометрический сигнал этанол/метанольного топливного элемента-сенсора как функция концентрации субстрата в пробе. Условия те же, что и на рис. 17.5; 1-метанол; 2-этанол.



ментах внутренняя емкость системы сначала была исчерпана (заштрихованная часть рисунка). Система одинаково чувствительна к этанолу и метанолу – источникам углерода для роста данного микроорганизма. Корреляция между кулонометрическим сигналом и количеством добавленного этанола или метанола иллюстрируется рис. 17.6. Прослежен также ход увеличения напряжения на клеммах элемента (или уменьшения потенциала биоанода) в течение 30 с после добавления этанола. Зависи-

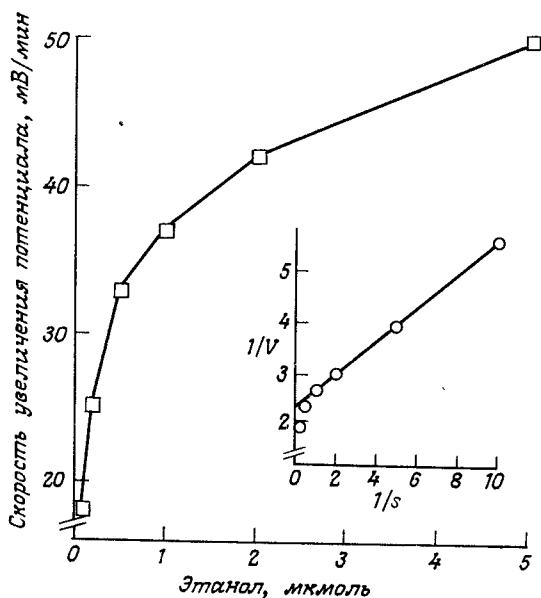


Рис. 17.7. Кинетический сигнал этанольного сенсора. Скорость возрастания потенциала измеряли через 30 с после добавления субстрата в ячейку. На врезке приведен график Лайнуивера–Бэрка; (S —концентрация этанола, мкмоль; V —скорость возрастания потенциала $\times 100$; $K_s = 18$ мкМ).

мость между скоростью изменения сигнала и концентрацией субстрата приведена на рис. 17.7. Эта система описывается кинетикой Михаэлиса–Ментен в диапазоне содержаний этанола 0,05–1,5 ммоль (концентрация анолита 3,5–105 мкМ), и, таким образом, она функционирует как весьма чувствительный сенсор с достаточно малым временем отклика. Интересно, что активным началом данного метилотрофного микроорганизма является NAD-зависимый фермент дегидрогеназа (см. в разделе 17.2 о преимуществах микроорганизмов как биокатализаторов, пункт е). Этот фермент можно использовать для селективных определений, поскольку он не окисляет углеводы (ср. раздел 17.2 о недостатках микроорганизмов, пункт а). Правда, этот фермент не очень устойчив (там же, пункт б).

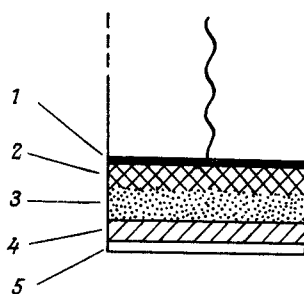
17.5. Перспективы развития микробных сенсоров

17.5.1. Общие соображения при конструировании микробных сенсоров

Попытки модифицировать описанный выше биотопливный элемент и превратить его в удобный на практике датчик предпринимаются во многих лабораториях. Уменьшение объема сенсора этого типа с 15 до 0,5 см³ сокращает «мертвое» время (расходуемое на перемешивание и установление равновесия в пористых электродах) от нескольких минут до 30 с и менее. Логическим продолжением этого направления является локализация микроорганизмов в небольшом объеме вблизи электрода.

На рис. 17.8 показано устройство многослойного сенсора в виде обычного электрода-датчика. Как и в других случаях, выбор конструкции биотопливного сенсора определяется его назначением—для длительного пользования или разовых измерений. В сенсорах одноразового действия рабочую часть датчика обычно выполняют в виде сменного дискового электрода или другого подобного устройства. Такие датчики привлекательны простотой конструкции и дешевизной массового производства при использовании углеродного пленочного покрытия, наносимого на бумагу или пластиковую основу (эта технология широко применяется при изготовлении кредитных

Рис. 17.8. Предлагаемая конструкция микробного сенсора. 1 – спеченная угольная пластина; 2 – пористый уголь; 3 – биоактивный слой; 4 – фильтрующий слой; 5 – защитная мембрана.



карточек). Миниатюризованный вариант биотопливного сенсора в сочетании со сменным датчиком удобен для клинического использования. При этом можно отобрать пробу, например крови, и провести анализ *ex vivo*, что исключает какую-либо возможность загрязнения компонентами сенсора (главную опасность с точки зрения токсичности представляют микроорганизмы и медиатор). В гл. 23 настоящей книги описан глюкозный датчик игольчатого типа.

17.5.2. Конструирование биоактивных слоев

Упрощенная схема, приведенная на рис. 17.8, очевидно, дает лишь приблизительное представление о возможностях конструирования биосенсоров. Различные конфигурации ферментных сенсоров рассмотрены, в частности, Шеллером и сотр. [44]. Особое внимание авторы уделяют характеристикам биоактивного слоя, являющегося важнейшей рабочей частью биосенсора. Одной из главных целей при разработке прототипа микробных сенсоров было выяснение того, что происходит в таком активном слое, содержащем биокатализатор, медиатор(ы) и другие необходимые компоненты. В свете этих экспериментальных исследований состав и структуру слоя в каждом конкретном случае можно модифицировать оптимальным образом. Ниже обсуждаются некоторые направления в конструировании активных слоев.

17.5.3. Иммобилизация микроорганизмов

Разработано много различных методов иммобилизации микроорганизмов [15]. Наиболее подходящими для удержания микроорганизмов на электроде или в непосредственной близости от него являются следующие:

17.5.3.1. Адсорбция. В отсутствие связующего агента микроорганизмы довольно прочно связываются с поверхностями абсорбентов, в том числе углерода, хотя и в разной степени [53]. К недостаткам этого простого подхода относится то, что количество связанной биомассы трудно контролировать и что изменения pH, ионной силы и т. п. могут приводить к десорбции.

17.5.3.2. Физическое удерживание. В пористом электроде микроорганизмы можно физически удерживать с помощью геля, например альгинатного, полиакриламидного, карагенового и т. п. или фотополимеризующегося поперечносшитого полимера, к которому для повышения гидрофобности могут пришиваться различные группы [22]. Мягкие условия изготовления электрода позволяют тщательно контролировать количество биомассы. Несмотря на то, что время пропитывания электрода исследуемым раствором, содержащим субстрат, должно быть порядка нескольких секунд, могут возникнуть ограничения, связанные с массопереносом. С другой стороны, это может стать преимуществом, поскольку при разумном выборе физических характеристик системы можно предотвратить проникновение загрязняющих веществ в анолит или

регулировать подвижность медиатора и его окислительно-восстановительные свойства.

17.5.3.3. Ковалентное связывание. Методы ковалентного связывания, используемые для ферментов, могут быть адаптированы и для целых клеток [57]. Плотный клеточный слой прочно удерживается на поверхности, что позволяет избежать проблем, связанных с диффузией. Лучшие из применяемых методов включают двухстадийный процесс, в котором сначала поверхностные группы, например карбоксилатные, активируют, используя карбодимид как сопрягающий реагент, а затем образующийся поверхностный полимер реагирует с микроорганизмами. При этом образуется активный слой, связывающий большое количество биомассы и обладающий повышенной биологической устойчивостью. Полученные недавно результаты показывают, что электрод с закрепленным этим методом монослоем, содержащим 1 мг микроорганизмов (сухой вес) на 100 см^2 (реальной поверхности), дает вполне удовлетворительный по величине сигнал (ток в миллиамперном диапазоне).

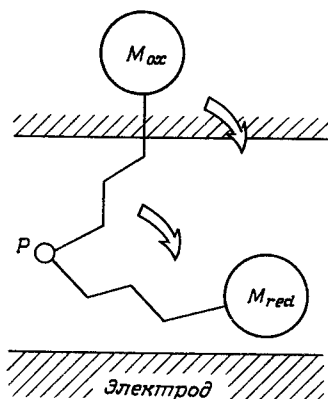
17.5.4. Редокс-медиаторные системы

Первые работы с описанными выше медиаторными топливными элементами и ферментными электродами пролили свет на различные проблемы, связанные с редокс-медиаторами. Особенно важно было бы идентифицировать или синтезировать такие медиаторы, которые могут сопрягать биокатализатор с электродом, избегая при этом потерь активного редокс-компонента во время измерения (хотя в приборах одноразового действия потеря медиатора или других компонентов вполне допустима). В датчиках для длительного использования, у которых сигнал может зависеть от концентрации медиатора и потеря его приводит к плохой воспроизводимости, концентрацию медиатора можно поддерживать постоянной при помощи контролируемого высвобождения из микрокапсул [33, 54]. Альтернативой является поиск медиаторов или их производных, размеры молекул которых слишком велики, чтобы проникать через сеть субстрат-проницаемого геля или какой-либо другой структуры, обеспечивающей иммобилизацию микроорганизмов. Ионные медиаторы могут удерживаться также противоположно заряженным полимером или компонентом сополимера, соответствующим образом локализованным или распределенным в гелевом носителе. Ниже рассмотрены некоторые другие возможные подходы, используемые в настоящее время.

17.5.4.1. «Заякоренные» медиаторы. В последние годы достигнут значительный прогресс в синтезе «специальных» полимеров [27], и имеется множество способов, с помощью которых органические или неорганические медиаторы можно «заякорить» на полимерных подложках [46] или прикрепить к клеточным стенкам. Можно представить себе, например, систему (рис. 17.9), в которой редокс-активный медиатор подвешен на гибкой молекулярной цепи — «якорной» точке (Р) линейного цепного полимера с открытой структурой. В такой «маятниковой» конструкции окисленная часть медиатора (M_{ox}) находит доступ к внутриклеточному источнику электронов, проникая через внешнюю клеточную стенку (верхняя часть рисунка), затем медиатор в восстановленной форме (M_{red}) диффундирует к электроду и вновь окисляется.

Внешние клеточные стенки микроорганизмов исключительно разнообразны по структуре и составу. Поэтому осуществимость предложенного выше механизма будет зависеть от того, какой тип микроорганизмов исследуется. В общем случае грам-отрицательные микроорганизмы устроены более сложно, чем грам-положительные. Доступ к восстановительным областям облегчен, если микроорганизм имеет экзоферменты, но становится все труднее в ряду: периплазматические ферменты — цитоплазматические ферменты — митохондрии в эукариотических клетках. Многие бактерии

Рис. 17.9. Схематическое изображение биокаталитического слоя, содержащего микроорганизмы: медиатор прикреплен к полимеру гибкой цепью.



имеют стенки толщиной 5–20 нм, состоящие главным образом из пептидогликана, цепочечного дисахаридного гетерополимера гликана с пептидными заместителями [26, 53]. Боковая цепь из 10–15 CH_2 -групп в принципе позволяет электронам по описанному выше механизму переправляться через зазор шириной 5–10 нм, что вполне достаточно для медиаторного переноса заряда из многих микроорганизмов даже в случае «экономного распределения» медиатора. (Одной частице медиатора на каждые 20 нм², или на 100 нм³ (при зазоре 5 нм), соответствует плотность 0,01 молекул/нм³, т.е. локальная концентрация составляет 0,01 моль/дм³.)

17.5.4.2. Микроорганизмы с «заданными» функциями. Об электронном переносе, составляющем «внутреннюю электрическую цепь» биохимического метаболизма, известно довольно много [19, 35], тогда как различные способы соединения этой внутренней цепи с внешней путем манипуляции микроорганизмами и придания им заданных свойств еще только предстоит исследовать. Можно представить себе механизмы такой связи без участия подвижных медиаторов, например прямой перенос электронов через молекулярный проводник, как показано на рис. 17.10. Медиаторный центр принимает электроны из восстановительного пула внутри микроорганизма и передает их на электрод по органическому «проводу» [3, 12, 38]. Молекулярный проводник (МП) должен быть, конечно, «биосовместимым» с внешней клеточной структурой. В качестве иммобилизующих проводящих носителей, по-видимому, перспективны проводящие полимеры, например используемый в батареях поли(N-винилкарбазол) [28].

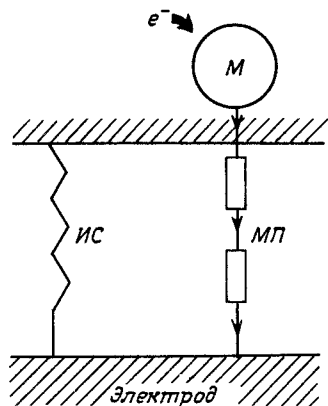


Рис. 17.10. Перенос электрона от микроорганизма на электрод через молекулярный проводник. М – рецептор-медиатор; ИС – иммобилизующая связь; МП – молекулярный проводник.

В случае более сложных микроорганизмов сопрягающий процесс существенно затруднен, особенно если восстановительные центры локализованы в митохондриях. «Функционализация» микроорганизмов путем введения соответствующим образом модифицированных окислительно-восстановительных реагентов могла бы позволить электронам перескакивать на доступные внешние пути. Создание таких электронных мостиков представляется вполне реальным в свете полученных недавно данных о туннелировании электронов на большие расстояния в белках, содержащих дополнительные функциональные группы [55]. Для придания акцепторному центру требуемых свойств к нему пришивают модифицирующий реагент, например комплекс переходного металла с желаемым окислительно-восстановительным потенциалом, и тем самым обеспечивают совместимость акцептора с внутриклеточным ферментом и его преимущественно гидрофобным окружением. После этого центр можно вводить в микроорганизм. Для введения «посторонних» компонентов в клетки можно использовать органические растворители, умеренные детергенты и другие реагенты, облегчающие перенос растворенных веществ через мембраны, при условии, что микроорганизмы некоторое время могут выдержать такую обработку [20, 34].

17.5.4.3. Электроды и электрохимические факторы. Введение медиатора в слой биокатализатора или прилегающий к нему слой налагает определенные диффузионные условия, влияющие на электрохимические свойства всей системы. Перенос окисленной и восстановленной форм медиатора (свободного или связанного) не должен быть настолько медленным, чтобы серьезно сказываться на времени отклика или стационарном токе вследствие концентрационной полярности. Плотность предельного тока i_d в диффузионном слое толщиной δ определяется выражением

$$i_d = \frac{DFc}{\delta},$$

где D и c — соответственно коэффициент диффузии и концентрация подвижных частиц. Для описанной выше схемы с «подвешенным на цепи» медиатором i_d составляет около $0,2 \text{ А/см}^2$ (для расчета использовали заниженное значение $D = 10^{-7} \text{ см}^2/\text{с}$; $c = 0,01 \text{ моль/дм}^3$; $\delta = 5 \text{ нм}$). Отсюда следует, что диффузия медиатора практически не ограничивает значения сигнала сенсора. Для экспериментальной проверки ограничений этого типа, налагаемых носителем, можно сравнить циклические вольтамперограммы для сенсоров с иммобилизованными и свободно суспендированными компонентами (микроорганизмами и медиаторами). Для сопряжения активных слоев через модифицированные электроды [1, 39, 40] можно использовать угольные электроды с поверхностными карбоксилатными, хинонными и серусодержащими группами.

17.5.5. Селективность, специфичность и помехи

Существует много способов видоизменения сенсоров, позволяющих избежать помех и повысить селективность. Здесь мы остановимся лишь на некоторых направлениях исследований в этой области.

17.5.5.1. Манипулирование с микроорганизмами. В отличие от отдельного фермента микроорганизм является многофункциональным биокатализатором, что, с одной стороны, налагает ограничение на многие параметры системы, а с другой, предоставляет широкий диапазон возможностей для манипулирования его свойствами. При использовании микроорганизма, утилизирующего, например, в качестве субстрата и аскорбат, и глюкозу, может наблюдаться искажение сигнала при определении одного из этих веществ в присутствии другого. Имеется, однако, ряд способов подавления поглощения или катаболизма мешающего вещества. Например, модифицируя соответствующим образом строение биокаталитического слоя или проводя биологи-

ческое манипулирование с микроорганизмами, можно регулировать значения K и тем самым добиваться различной селективности сенсора в разных концентрационных диапазонах. Другой подход к повышению селективности заключается в использовании мутантов: так, штаммы, не усваивающие глюкозу, пригодны для определения второго субстрата в средах с высоким содержанием глюкозы.

Диапазон применимости сенсоров в принципе можно расширить, используя микроорганизмы и в другом качестве: как фильтры для веществ, например глюкозы и кислорода, которые влияют на первичные электрохимические или биоэлектрохимические реакции в чувствительном элементе сенсора. Такой «очищающий» слой целесообразно помещать между активным слоем и анализируемым раствором (см. рис. 17.8).

17.5.5.2. Дифференциальные измерения. Как принято обычно в аналитической практике, влияние примесей при измерениях в биологических и промышленных жидкостях можно минимизировать разумным использованием холостых проб. Измерения можно проводить, например, в дифференциальной ячейке, состоящей из двух размещенных «спиной к спине» одинаковых ячеек. Чувствительная часть такой дифференциальной ячейки состоит из двух тонких биоанодов на одном датчике. Преимуществом такой конструкции является возможность градуировки с использованием нуля-метода и дополнительная компенсация колебаний температуры, pH и ионной силы. Для компенсации влияния мешающих субстратов можно также рекомендовать «холостой сенсор», не содержащий биокатализатор для определяемого вещества, но содержащий биокатализатор для мешающего вещества, что позволяет вычесть вклад последнего в амперометрический сигнал основного сенсора.

17.5.5.3. Другие способы модификации биоактивного слоя. Чувствительность и время отклика датчика, сигнал которого определяется процессом биологического восстановления, могут зависеть от давления кислорода. Хотя некоторые сенсоры могут функционировать даже при наличии конкурентных окислительных реакций, особенно в случае очень активных микроорганизмов, которые быстро создают собственную анаэробную среду, целесообразно все же использовать кислород-независимые медиаторы, например ферроцены [14]. Этим problem можно также избежать, используя очищающий слой, неактивный или частично неактивный по отношению к определяемому веществу, или с помощью «электрохимической модуляции» [45]. В последнем случае парциальное давление кислорода контролируют с помощью внутреннего сетчатого электрода. Эти методы используют также для повышения селективности глюкозного ферментного электрода за счет уменьшения потока аскорбата в биокаталитическую зону. В предварительных исследованиях, описанных в разделе 17.4, небольшую аликвотную порцию анализируемого раствора разбавляли прямо в измерительной ячейке. Используя микробный датчик, стадию разбавления можно было бы исключить, однако в концентрированных растворах микроорганизмы могут стать насыщенными по субстрату и снизить на длительное время свою восстановительную активность, тем самым ограничивая чувствительность сенсора к субстрату. Эту проблему (не столь серьезную для разового измерения) можно решить путем ограничения количества субстрата, проникающего через активный слой. С этой целью размещают очищающий слой либо ограничивающий диффузию гель или полимерную мембрану между раствором и биокатализатором (см. раздел 17.5.5.1). Степень утилизации субстрата зависит также от используемого медиатора, его концентрации и локализации, причем влияние этих факторов ослабляется при соответствующей конструкции сенсора.

17.6. Дальнейшие перспективы

В этой главе мы попытались описать пока только зарождающуюся технологию, которая в перспективе позволит создавать биосенсоры с меньшим временем отклика

и большей чувствительностью в результате выяснения механизма преобразования сигнала, т. е. механизма электрического «подключения» к ранним стадиям микробного катаболизма. Последнее исключает требование достижения стационарного состояния микроорганизма по генерируемому продукту при изменении концентрации определяемого вещества, что необходимо в косвенном методе. Ясно, однако, что микробные биосенсоры прямого действия сохраняют многие достоинства и недостатки, характерные для сенсоров «косвенного» типа: области применения сенсоров обоих типов во многих случаях совпадают (см. раздел 17.2), но дальнейшая разработка обоих методов потребует еще многих исследований.

При написании этой главы делались оговорки относительно применимости микробных сенсоров для многих применений, например клинического анализа, ферментационного контроля и в пищевой промышленности. Хотя такие оговорки не влияют на развитие исследований в некоторых странах, особенно Японии, имеет смысл проанализировать возможные причины такого скептицизма. Если допустить, что выпуск биосенсоров может быть экономически оправдан, что предполагается во всей этой книге, то, очевидно, они должны удовлетворять двум основным требованиям: быть работоспособными и безопасными. В настоящее время, может быть, нереалистично ожидать создания на базе микробных биосенсоров аналитических методик, которые, например, удовлетворяли бы стандартам (кстати, довольно жестким) лучших промышленных химико-аналитических лабораторий. Однако литературные данные и результаты работ, проводимых в промышленных лабораториях, свидетельствуют, что поведение сенсоров на основе интактных клеток плохо воспроизводимо, поэтому их трудно оценить адекватно и объективно. Надежды на усовершенствование микробных сенсоров связаны с более глубоким изучением фундаментальных аспектов механизмов их функционирования наряду с использованием новых материалов и конструктивных решений. Серьезной проблемой, вызывающей опасения, является риск загрязнения исследуемых материалов клеточным биокатализатором. Эту проблему можно преодолеть только после уверенной демонстрации безопасности микробных сенсоров, которая будет тем более убедительной, если удастся улучшить их эксплуатационные характеристики в целом. Биотехнологические новшества быстро усваиваются и принимаются, а предубеждение против использования «микробов», возможно, вскоре будет проглочено и переварено вместе с порцией мицелиального белка в пирожке из супермаркета!

Благодарности

Мы благодарим фирму Johnson Matthey за предоставление во временное пользование электродных материалов. С. Д. Роллер выражает благодарность фонду Cambridge Life Sciences за финансовую поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Albery W.J., Hillman R.A.* Modified electrodes. *Ann. Rep. Prog. Chem.*, C, **78**, 377–437 (1981).
2. *Aston W.J., Turner A.P.F.* Biosensors and biofuel cells. In *Biotech. Genet. Eng. Rev.* (ed. G. Russell), Vol. 1, pp. 89–120. Intercept, Newcastle-upon-Tyne, 1984.
3. *Aviram A.* Molecular components for electronic device function—an overview. *Proc. First World Conf. Commercial Applications and Implications of Biotechnology (Biotech'83)*, pp. 695–704. Online Publications, London, 1983.
4. *Bennetto H.P.* Microbial fuel cells. In *Life chemistry reports* (eds. A. M. Michelson, J. V. Bannister), Vol. 2, no. 4, pp. 363–453. Harwood Academic, London, 1984.
5. *Bennetto H.P., Stirling J.L., Tanaka K.* Reduction of 'redox' mediators by NADH and electron transduction in bioelectrochemical systems. *Chem. and Ind. (London)*, 695–7 (1985).
6. *Bennetto H.P., Tanaka K., Matsuda K.* Bio-fuel cell containing algae. In *Charge and field effects in biosystems* (eds. M.J. Allen, P. N. R. Usherwood), pp. 515–522. Abacus Press, Tunbridge Wells, 1984.

7. *Bennetto H.P., Dew M.E., Stirling J.L., Tanaka K.* Rates of reduction of phenothiazine 'redox' dyes by *E. coli*. Chem and Ind. (London), 776-8 (1981).
8. *Bennetto H.P., Stirling J.L., Tanaka K., Vega C.A.* Microbial fuel cells. Soc. Gen. Microbiol. Quarterly, **8**, 37 (1980).
9. *Bennetto H.P.* Anodic reactions in microbial fuel cells. Biotechnol. Bioeng., **25**, 559-68 (1983).
10. *Besenhard J.O., Fritz H.P.* The electrochemistry of carbon blacks. Angew. Chemie, **22**, 950-975 (1983).
11. *Bryce M.R., Murphy L.C.* Organic Metals. Nature, **309**, 119-126 (1984).
12. *Cass A.E.G.* Protein electrochemistry: current studies and potential applications. In Life Chemistry Reports (eds. A.M. Michelson, J.V. Bannister), Vol. 2, no. 4, pp. 321-362. Harwood Academic, London, 1984.
13. *Cass A.E.G., Davis G., Francis G.D., Hill H.A.O., Aston W.J., Higgins I.J., Plotkin E.V., Scott L.D.L., Turner A.P.F.* Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. Anal. Chem., **56**, 667-71 (1984).
14. *Chibata I., Wingard L.B., Jr.* Applied biochemistry and bioengineering; Vol. 4: Immobilized cells. Academic Press, London, 1983.
15. *Clarke D.J., Calder M.R., Carr R.J.G., Blake-Coleman B.C., Moody S.C., Collinge T.A.* The development and application of biosensing devices for bioreactor monitoring and control. Biosensors, **1**, 213-320 (1985).
16. *Corcoran C.A., Rechnitz G.A.* Cell-based biosensors. Trends in Biotechnol., **3**, 92-6 (1985).
17. *Delaney G.M., Bennetto H.P., Mason J.R., Roller S.D., Stirling J.L., Thurston C.F.* Electron transfer coupling in microbial fuel cells. 2. Performance of fuel cells containing selected microorganism-mediator-substrate combinations. J. Chem. Tech. Biotechnol., **34B**, 13-27 (1984).
18. *Delaney G.M., Bennetto H.P., Mason J.R., Roller S.D., Stirling J.L., Thurston C.F.* Electron transduction from enzymes and bacteria. Anal. Proc., **23**, 143-4 (1986).
19. *Dreyer J.L.* Electron transfer in biological systems: an overview. Experientia, **40**, 653-776 (1984).
20. *Felix H.* Permeabilized cells. Anal. Biochem., **120**, 211-234 (1982).
21. *Findl E., Strope E.R., Conti J.C.* Electrochemical techniques in the biological sciences. In Comprehensive treatise of electrochemistry, Vol. 10, Bioelectrochemistry (eds. S. Srinivasan, Y.A. Chizmadzhev, J.O. M Bockris, B.E. Conway, E. Yeager), pp. 491-529. Plenum Press, New York, 1985.
22. *Fukui S., Tanaka A.* Immobilized microbial cells. Ann. Rev. Microbiol., **36**, 145-72 (1982).
23. *Guilbault G.G.* Analytical uses of immobilized enzymes. Chapter 3v, pp. 211-26. Marcel Dekker, New York, 1984.
24. *Gunsalus I.G., Schuster C.W.* Metabolism. In The bacteria (eds. I. Gunsalus, R.Y. Stanier), Vol. 2. Academic Press, New York, 1961.
25. *Hanazato Y., Shiono S.* Bioelectrode using two hydrogen ion sensitive field effect transistors and a platinum wire pseudo reference electrode. In Chemical sensors (eds. T. Seiyama, K. Fueki, J. Shiokawa, S. Suzuki), Analytical Chem. Symp. Series, Vol. 17, pp. 513-8. Kodansha/Elsevier, Tokyo, 1983.
26. *Inoue M.* Bacterial outer membranes: Biogenesis and functions. Academic Press, London, 1980.
27. *Ise N., Tabushi I.* Introduction to speciality polymers. Cambridge University Press, London, 1983.
28. *Kakuta T., Shirota Y., Mikawa H.* A rechargeable battery using electrochemically doped poly(*N*-vinylcarbazole). J. Chem. Soc. Chem. Commun., 553-5 (1985).
29. *Karube I., Suzuki S.* Application of biosensor to fermentation processes. Ann. Rep. Ferment. Processes, **6**, 203-236 (1983).
30. *Karube I.* Amperometric and potentiometric determinations with immobilised enzymes and microorganisms. Ion-selective Elec. Rev., **6**, 15-58 (1984).
31. *Karube I., Matsunaga T., Suzuki S.* A new microbial electrode for BOD estimation. J. Solid Phase Biochem., **2**, 97-104 (1977).
32. *Kobos R.K.* Microbe-based electrochemical sensing systems. Trends in Analyt. Chem., **2**, 154-7 (1983).
33. *Kost J., Langer R.* Controlled release of bioactive agents. Trends in Biotechnol., **2**, 47-51 (1984).
34. *Leive L.* Studies on the permeability change produced in coliform bacteria by ethylenediaminetetracetate. J. Biol. Chem., **243**, 2373-2380 (1968).
35. *Losada M., Hervas M., De La Rosa M.A., De La Rosa F.F.* Energy transduction in bioelectrochemical systems. Bioelectrochem. Bioenerg., **11**, 193-230 (1983).
36. *Mărgineanu D.-G., Vais H., Ardelean I.* Bioselective electrodes with immobilized bacteria. J. Biotechnol., **3**, 1-9 (1985).
37. *Matsunaga T., Karube I., Suzuki S.* A specific microbial sensor for formic acid. European J. Appl. Microbiol. Biotech., **10**, 235-43 (1980).
38. *Munn R.W.* Molecular electronics. Chem. in Britain, **20**, 518-24 (1984).
39. *Murray R.W.* Chemically modified electrodes. Accounts Chem. Res., **13**, 135-41 (1980).
40. *Murray R.W.* Chemically modified electrodes. In Electroanalytical chemistry (ed. A.J. Bard), Vol. 13, pp. 191-368. Marcel Dekker, New York and Basel, 1984.

41. Proctor B.E., Greenlie D.G. Reduction-oxidation potential indicators in quality control of foods. 1. Correlation of resazurin reduction rates and bacterial plate counts. *Food Res.*, **4**, 41-9 (1939).
42. Roller S.D., Bennetto H.P., Delaney G.M., Mason J.R., Stirling J.L., Thurston C.F. Electron transfer coupling in microbial fuel cells. 1. Comparison of redox-mediator reduction rates and respiratory rates of bacteria. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **34B**, 3-12 (1984).
43. Roller S.D., White D.R., Jr. A bio-fuel cell for utilisation of lactose wastes. *Proc. First World Conf. Commercial Applications and Implications of Biotechnology (Biotech'83)*, pp. 655-663. Online Publications, London, 1983.
44. Scheller F.W., Strnad G., Renneberg R., Kirstein D. Potentialities of protein electrochemistry in analytics. In *Charge and field effects in biosystems* (eds. M.J. Allen, P.N.R. Usherwood), pp. 483-90. Abacus Press, Tunbridge Wells, 1984.
45. Scheller F.W., Schubert F., Renneberg R., Muller H.-G., Janchen M., Weise H. Biosensors: trends and commercialisation. *Biosensors*, **1**, 135-160 (1985).
46. Sheats J.E., Pittman C.U., Jr., Carraher C.E., Jr. Organometallic polymers. *Chem. in Britain*, **20**, 709-15 (1984).
47. Simpson D.L., Kobos R.K. Ammonia gas sensor for microbial assay of tetracycline, gentamycin, streptomycin and neomycin. *Anal. Chim. Acta*, **164**, 273-7 (1984).
48. Stirling J.L., Bennetto H.P., Delaney G.M., Mason J.R., Roller S.D., Tanaka K., Thurston C.F. Microbial fuel cells. *Biochemical Society Transactions*, **11**, 451-3 (1983).
49. Thurston C.F., Bennetto H.P., Delaney G.M., Mason J.R., Roller S.D., Stirling J.L. Glucose metabolism in a microbial fuel cell. Stoichiometry of product formation in a thionine-mediated *Proteus vulgaris* fuel cell and its relation to coulombic yields. *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 1393-1401 (1985).
50. Turner A.P.F., Aston W.J., Higgins I.J., Davis G., Hill H.A.O. Applied aspects of bioelectrochemistry; fuel cells, sensors and bioorganic synthesis. *Biotech. Bioeng. Symp.*, No. **12**, 401-12 (1982).
51. van Dijk C., Laane C., Veeger C. Biochemical fuel cells and amperometric sensors. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, **104**, 245-52 (1985).
52. Wang J. Reticulated vitreous carbon—a new versatile electrode material. *Electrochim. Acta*, **26**, 1721-6 (1981).
53. Ward J.B., Berkeley R.C.W. The microbial cell surface and adhesion. In *Microbial adhesion to surfaces* (eds. R.C.W. Berkeley, J.M. Lynch, J. Melling, P.R. Rutter, B. Vincent), pp. 47-66. Soc. Chem. Ind./Ellis Horwood, Chichester, 1980.
54. Williams A. The controlled release of bioactive agents. *Chem. in Britain*, **20**, 221-4 (1984).
55. Williams R.J.P., Concar D. Long-range electron transfer. *Nature*, **322**, 213-4 (1986).
56. Wingard L.B., Jr., Shaw C.H., Castner J.F. Bioelectrochemical fuel cells. *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 137-142 (1982).
57. Wiseman A. *Handbook of Enzyme Biotechnology* (2nd edn.). Ellis Horwood, Chichester, 1985.

Применение ферментных амперометрических биосенсоров в анализе реальных объектов

*Фридер В. Шеллер, Доротея Пфаифер, Флориан Шуберт,
Рейнхард Реннеберг, Дитер Куриттейн*

18.1. Введение

Судя по числу публикаций и патентов, а также выпускаемых серийно анализаторов, амперометрические биосенсоры представляют наиболее развитое направление разработки биоспецифических электродов. В них объединяются, с одной стороны, преимущества электродных фарадеевских процессов, например высокая чувствительность, линейная зависимость сигнала от концентрации, селективность (за счет работы при разных потенциалах) и независимость от буферной емкости анализируемого раствора, и, с другой стороны, высокая субстратная специфичность ферментов или более интегрированных биокаталических систем, таких, как органеллы, микроорганизмы или срезы тканей. Принцип действия амперометрических сенсоров заключается в определении градиента концентрации электроактивного продукта ферментативной реакции. Поэтому они могут детектировать только образование или расход участвующих в реакции веществ и не пригодны для индикации изменений плотности электронов только вследствие образования комплекса без химического превращения. Более того, использование амперометрических сенсоров обычно ограничивается катализируемыми оксидоредуктазами реакциями с участием двух субстратов, поскольку в окислительно-восстановительных реакциях электроны переносятся между двумя веществами. На скорость таких реакций влияют концентрации как субстрата, так и кофактора. Это стимулировало разработку систем, позволяющих снять ограничения по концентрации кофактора, например систем с вспомогательным электродом, генерирующим кислород, химически модифицированных медиаторных индикаторных электродов. Используют также прямой перенос электрона между белковой простетической группой и редокс-электродом в безреагентном режиме. В результате не только фермент, но и кофактор в известных пределах не влияют на показания амперометрических биосенсоров. Кроме радикального удешевления реагентов наиболее важным преимуществом амперометрических биосенсоров является значительное упрощение измерительной аппаратуры: они представляют собой объединенные в одном блоке диализатор, ферментный реактор и электрохимический детектор (рис. 18.1). Это основная особенность анализаторов на основе амперометрических биосенсоров.

В амперометрических биосенсорах используют преимущественно реакции, катализируемые оксидазами. Это связано с простотой электрохимического детектирования O_2 и H_2O_2 . Если при превращении молекулы определяемого вещества не образуется продукта, концентрацию которого легко измерить, то его можно получить с помощью дальнейшей ферментативной реакции. Такие последовательные реакции обычно используют при определении сложных эфиров, олигосахаридов и амидов. В амперометрических сенсорах можно применять и другие типы сопряженных реакций, основанных на рециклировании исследуемой молекулы, с тем чтобы «умножить» количество продукта или устранить влияние мешающих веществ.

В патентах и публикациях описаны амперометрические биосенсоры для определения

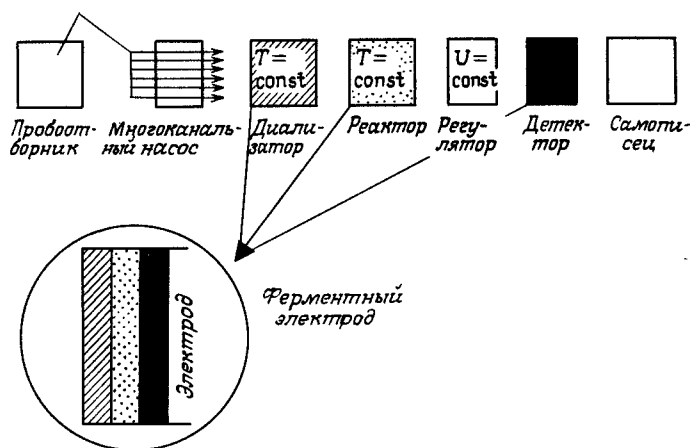


Рис. 18.1. Объединение диализатора, ферментного реактора и электрохимического датчика в ферментных электродах.

около 80 различных веществ, включая субстраты, кофакторы, простетические группы, ферменты, антитела, ингибиторы и активаторы. Диапазон линейности концентрационной зависимости для этих сенсоров обычно охватывает от двух до четырех порядков концентрации с пределом обнаружения 1–100 мкМ. Серийно выпускаются анализаторы с амперометрическими биосенсорами для определения 11 различных веществ.

Цель этой главы – продемонстрировать возможности и ограничения использования амперометрических биосенсоров в клинической диагностике, ферментационном контроле, в пищевой промышленности и для контроля загрязнения окружающей среды.

18.2. Применение амперометрических биосенсоров

18.2.1. Низкомолекулярные растворимые вещества

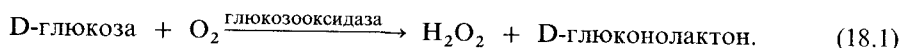
К этой группе принадлежит большинство аналитически важных веществ. Ее типичными представителями являются моносахариды, олигосахариды, спирты, органические кислоты и аминокислоты. В этой главе будут рассмотрены также мочевая кислота и креатин, растворимые на уровне микромолей. В аналитической практике их иногда определяют электроферментативными методами. В лабораторных анализах амперометрические биосенсоры используют, кроме того, и для определения неорганических ионов, обладающих активаторными или ингибиторными свойствами, и простетических групп, например FAD.

18.2.1.1. Определение глюкозы. Точное и быстрое определение глюкозы является существенным не только в аналитических клинических лабораториях, но и для непрерывного наблюдения больных диабетом. Глюкозный сенсор имеет большое значение для технологического контроля в микробиологической и пищевой промышленности. Его можно было бы применять и для определения ди- и полисахаридов, а также амилазы. Разработкой и оптимизацией глюкозных сенсоров и анализаторов занимается около 50 групп ученых в различных странах.

18.2.1.2. Определение глюкозы в крови. Это незаменимый тест для точной диагностики и терапии сахарного диабета, а также многих других нарушений. Нормальный уровень содержания глюкозы в крови около 5 ммоль/л, тогда как при патологии эта величина может увеличиваться до 50 ммоль/л. В моче нормальное содержание глю-

козы составляет около 1 ммоль/л; в этом случае для большинства аналитических методов серьезной проблемой являются мешающие примеси.

Приблизительно 5 процентов взрослого населения развитых стран являются диабетиками. Важную роль в лечении диабета играла и продолжает играть аналитическая химия. С этой целью было разработано бесчисленное множество методов. Однако благодаря специфичности ферментных реакций и чувствительности электрохимических методов в этой области все более популярными становятся глюкозные сенсоры. Схема катализируемого глюкозооксидазой (GOD, EC 1.13.4) окисления глюкозы имеет следующий вид:



Отсюда видно, что концентрацию глюкозы можно измерять, регистрируя либо расход кислорода по его восстановлению на катоде, либо образование пероксида водорода по его окислению на аноде.

18.2.1.3. Мешающие вещества. В биологических препаратах обычно присутствуют различные восстановители вещества, например аскорбиновая кислота, мочевиная кислота, глутатион и т. д., которые существенно влияют на окисление H_2O_2 . Для сведения к минимуму этого эффекта возможны четыре подхода:

1) Удаление части мешающих веществ с помощью отрицательно заряженной диализной мембраны, которая задерживает до 0,0852 ммоль/л аскорбиновой кислоты и 0,464 ммоль/л мочевиной кислоты [33]. Более высокие концентрации этих веществ, а также глутатион и билирубин влияют на сигнал глюкозоанализатора.

2) Включение в систему компенсирующего электрода с не содержащей фермента коллагеновой мембраной и регистрация разности токов двух сенсоров [71] (см. также гл. 22).

3) Использование H_2O_2 -селективной асимметричной ацетилцеллюлозной мембраны, исключающей проникновение к поверхности электрода большинства мешающих веществ. Такие мембраны используются фирмами Yellow Springs Instruments Corp. (США) [46] и Fuji Electric (Япония) [73]. Однако такие составные мембраны довольно дороги.

4) Введение дополнительного диффузионного сопротивления за ферментным слоем, что позволяет быстро и точно измерять концентрацию глюкозы по производной сигнала вообще без избирательно проницаемой мембраны [59].

При электрохимическом определении глюкозы в крови по расходу кислорода измеряемые значения не являются истинными, поскольку часть кислорода в анализируемом растворе связана с деоксигемоглобином.

18.2.1.4. Чувствительность. В отличие от определения по H_2O_2 , начинающегося с очень низкого фонового тока, что позволяет существенно повысить чувствительность детектора (предел обнаружения глюкозы до 10^{-6} моль/л), в случае восстановления O_2 регистрируют отклонение от базового кислородного тока. Поэтому чувствительность анализа обычно ниже на 2–3 порядка величины [71]. Диапазон линейности сигнала глюкозных сенсоров охватывает четыре порядка. Он, очевидно, ограничен диффузией кислорода в реакционный слой. Вводя дополнительный внешний диффузионный барьер перед глюкозооксидазной мембраной, диапазон линейности можно сдвинуть в область более высоких концентраций.

18.2.1.5. Устойчивость. Важной проблемой клинической диагностики является устойчивость глюкозы в пробах крови. В случае интактных эритроцитов концентрация глюкозы в крови понижается за 2 часа почти на 20%. То же наблюдается в присутствии 0,24 ммоль/л NaF , действующего как ингибитор гликолиза. При разбавлении крови гипотоническим буфером, приводящим к гемолизу крови, гликолиз полностью подавляется, а концентрация глюкозы остается постоянной более 24 ч [2].

18.2.1.6. Глюкозоанализаторы. Результатом изучения проблемы сенсоров во многих фирмах стала разработка глюкозоанализаторов. В табл. 18.1 сравниваются наиболее важные аналитические характеристики этих приборов. Первый прибор для определения глюкозы на основе амперометрического ферментного электрода разработан фирмой Yellow Springs Instruments Corp. (YSI-23A) в 1979 г. (см. гл. 1). Корреляция между величинами, полученными обычным методом с применением гексокиназы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и с помощью YSI-23A, вполне удовлетворительна для плазмы

Таблица 18.1. Глюкозоанализаторы на основе амперометрических ферментных электродов

Фирма	Фермент + добавляемый реагент	Диапазон определяемых концентраций, ммоль/л	Объем пробы, мкл	Частота измерений, проб/ч	Погрешность, %	Стабильность
<i>Неавтоматизированные анализаторы</i>						
Yellow Springs Instruments (США), модель 23A	GOD	1,0–45,0	25	40	2,0	300 измерений
ZWG (ГДР): Glukometer GKM 01	—»—	0,5–50,0	20–25	60–90	1,5	1000 измерений
Radelkis (Венгрия): OP-G 1-7113-S	—»—	1,7–2,0	100	40	5,0–10,0	250 дней
Институт биохимии (Вильнюс, СССР): Энзалист-Г	—»—	0,5–30,0	50	60	5,0	—
Фермент (СССР): Аплама	—»—	2,5–30,0	—	20	3,0	—
Fuji Electric (Япония): Gluco 20A	—»—	0–27,0	20	80–90	1,7	500 измерений
Seres (Франция): Enzymat	—»—	1,0–22,0	200	60	—	500 измерений
Solea – Tacussel (Франция): глюкозный электрод	—»—	0,0001–1,0	—	—	2,0	1000 измерений
Hoffman – La Roche & Co. (Швейцария): Глюкозоанализатор 5410	—»—	2,5–27,5	100	$t_r = 60 \text{ с}^*$	1,5	8 недель
Институт технической химии АН ГДР	GOD + $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	0–55,5	800	15	3,0	8 недель
Analytical Instruments (Япония): Glucoroder-E	GOD + <i>n</i> -хинон	0–55,5	20–40	120–150	2,0	—
<i>Автоматические проточные анализаторы</i>						
Daiichi (Япония): Auto & Stat GA-1110	GOD	1,0–40,0	100–250	—	1,0	—
MLW (ГДР): ME Glucose 6	—»—	1,0–44,0	20	80–120	1,2	1000 измерений
Карлов Университет (Прага, Чехословакия), отдел биохимии	—»—	0,0006–5,0	—	60	3,5	30 дней
<i>Приборы непрерывного действия</i>						
Life Science Instr., Div. Miles (США): Биостатор GCIS	—»—	до 27,5	2**	—	5	50 часов
Центральный институт диабета (Карлсбург, ГДР)	—»—	до 40,0	15–20**	—	—	—
Университет г. Осака, медицинский институт, медицинский факультет (Япония)	—»—	2,85–22,0	—	—	—	3 дня

* время отклика; ** время задержки, мин.

и для сыворотки. Результаты определения глюкозы в цельной крови в литературе не представлены [9]. Исследовательский набор венгерской фирмы Padelkis [18] и устройство Glucoder-E фирмы Analytical Instruments (Япония) основаны на контроле расхода кислорода. Поэтому эти приборы не пригодны для определения глюкозы в крови.

Фирмы Seres и Solea – Tacussel (Франция) и Институт биохимии (Вильнюс, СССР) не приводят сведений о точности их глюкозоанализаторов и корреляции результатов, получаемых с помощью этих приборов и обычных методов. Очень мало информации опубликовано и о ферментных электродах фирмы Universal Sensors (США) [15] (гл. 9).

Одну из наиболее важных проблем, возникающих при определении глюкозы в крови, можно продемонстрировать на примере японских фирм Fuji Electric Co. и Daiichi. В приборе Gluco 20 A (фирма Fuji Electric Co.) анализируется 20 мкл неразбавленной цельной крови. Данные, полученные на этом приборе и с помощью гексокиназного метода, в случае сыворотки вполне согласуются. Однако из сравнительных исследований известно, что концентрация глюкозы в цельной крови всегда на 13% ниже, чем в сыворотке [47]. Аналогичные результаты для цельной крови получены на автоматическом проточном анализаторе GA-1110 фирмы Daiichi. С помощью ферментного метода найдено следующее соотношение между концентрацией глюкозы в разбавленной (y) и неразбавленной (x) крови: $y = 0,793x + 0,471$ ммоль/л. Наша группа специально изучала эту проблему. Используя Glukometer GKM 01 (ZWG, Берлин, ГДР), мы сравнивали концентрацию глюкозы в неразбавленной крови, стабилизированной ЭДТА, и в крови, разбавленной изотоническим декстран-фосфатным буферным раствором в соотношении 1:10. Полученная корреляционная прямая показана на рис. 18.2. При введении в анализатор неразбавленной крови получены значения, на 18,8% меньшие, чем в случае разбавленных проб. Это различие связано с тем, что в неразбавленной цельной крови определяется не вся глюкоза, так как часть ее находится в эритроцитах. Вот почему реальная ценность такого способа определения глюкозы невелика. При использовании разбавленной (1:10) крови или сыворотки результаты,

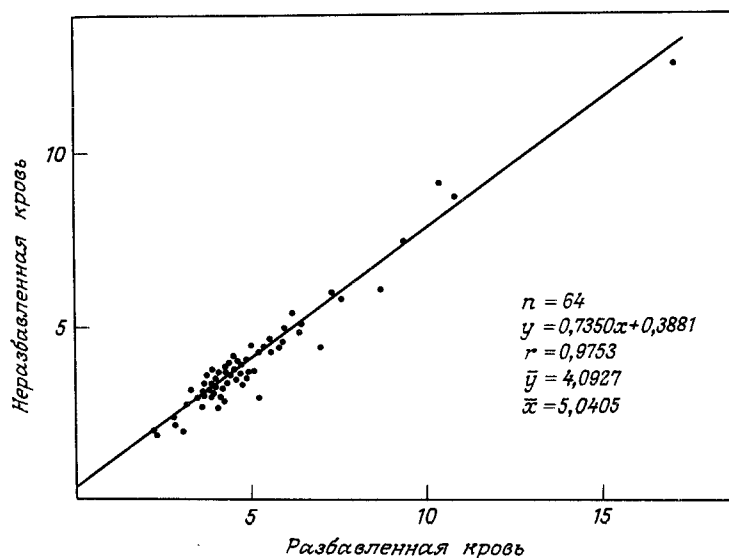


Рис. 18.2. Корреляция между концентрациями глюкозы (ммоль/л) в разбавленной 1:10 и неразбавленной цельной крови, найденными с помощью глюкозооксидазного электрода.

получаемые на приборе GKM 01 с детектированием H_2O_2 , хорошо согласуются с данными метода с глюкозооксидазой и пероксидазой. С тем же сенсором GOD результаты анализа крови, проведенного с помощью автоматического проточного анализатора ME Glucose 6 [43], отлично согласуются с данными высокоселективного глюкозодегидрогеназного метода: $y = (1,003 \pm 0,006)x - (0,015 \pm 0,045)$ ммоль/л; $r = 0,996$, $n = 196$.

При постоянном наблюдении больных диабетом необходима система вливания инсулина, контролируемая уровнем глюкозы. Для преодоления различных трудностей, связанных, например, со стабильностью ферментной мембраны или широким концентрационным диапазоном, прилагались большие усилия. Первая система с обратной связью, Biostatog, описана в работе [13]. При использовании разбавленной крови ферментный электрод этой системы работает стабильно до 50 ч и дает линейный отклик при концентрации глюкозы до 27,5 ммоль/л. В работах [1, 67] предложены имплантируемые сенсоры с электродами игольчатого типа (см. также гл. 23). В обоих приборах изменяется концентрация глюкозы в промежуточной ткани, которая ниже, чем в венозной крови. Исследования Шичири [67] привели к созданию переносной искусственной поджелудочной железы массой 400 г, состоящей из игольчатого сенсора, миникомпьютера и системы привода двух шприцов.

В разработанном Крэнфилд–Оксфордской группой исследователей [7] прототипе персонального портативного глюкозного монитора для больных диабетом используется модифицированный ферроценом глюкозооксидазный сенсор. Сигнал этого сенсора не зависит от концентрации кислорода и в случае неразбавленной цельной крови хорошо согласуется с данными стандартных методов анализа плазмы (см. также гл. 15 и 16).

18.2.1.7. Контроль бродильных процессов. Ключевой проблемой в этой области является непрерывный мониторинг концентраций различных субстратов и продуктов биохимических реакций [12]. Основные трудности связаны с колебаниями концентрации кислорода в бродильном бульоне и потребностью в кислороде для реакции, катализируемой глюкозооксидазой.

В работе [42] периодический анализ проб бродильного бульона проводили путем дифференциального измерения токов системы, включающей глюкозный сенсор и вспомогательный электрод; в качестве акцептора электронов использовали гексацианоферрат(III). Для решения этой же задачи авторы [3] использовали увеличение концентрации восстановленного акцептора водорода, *n*-хинона. Дополнительно проводили продувку системы инертным газом.

В работе [55] предложен глюкозный электрод с ферментной мембраной, характеризующейся высокой растворимостью кислорода. Перед анализом мембрану насыщают воздухом, после чего она служит резервуаром, поставляющим достаточное количество кислорода для глюкозооксидазной реакции. Этот метод, однако, не пригоден для анализа *in situ* в ферментационных процессах.

Наиболее интересной разработкой в этой области является стабилизированный по отношению к кислороду глюкозный электрод с электрохимической генерацией кислорода [12]. Таким образом, колебания концентрации растворенного в пробе кислорода не влияют на выходной сигнал (см. также гл. 19).

18.2.1.8. Галактоза и лактоза. Галактоза служит альтернативным источником углеводов и улучшает гомеостатическую регуляцию глюкозы у недоношенных детей. Она в принципе может оказывать токсическое действие, поэтому необходимы чувствительные методы ее определения. В норме концентрация галактозы в сыворотке ниже 0,24 ммоль/л. В виде дисахарида галактоза содержится только в молоке. В грудном молоке ее средняя концентрация составляет 0,3–0,6 ммоль/л, а в коровьем молоке – 0,25–0,28 ммоль/л. Значительный интерес представляет и разработка методов

определения лактозы, поскольку ее содержание в пищевых продуктах указывает на количество добавленного в них порошкового молока.

И галактозу, и лактозу определяют, используя галактозооксидазу (ЕС 1.1.3.9), иммобилизованную на расположенной перед электродом ацетилцеллюлозной мембране, избирательно проницаемой для пероксида водорода [70]. Линейная зависимость от концентрации при определении галактозы или лактозы наблюдается в диапазоне по меньшей мере от 0 до 30 ммоль/л. Как правило, мембрана может служить в течение 10 дней, а погрешность измерений не хуже 2%. Из физиологически активных веществ мешает определению только дигидроксиацетон.

Иммобилизованный ферментный электрод для определения лактозы включен в специальный комплект анализатора YSI Industrial Analyzer модели 27 (фирма Yellow Springs Instruments) и автоматического анализатора Enzymat (фирма Seres, Франция). Кроме того, фирма Yellow Springs Instruments предлагает специальную методику определения фруктозы с помощью иммобилизованной галактозооксидазы по реакции, до сих пор не описанной в литературе [20].

Разработаны также лактозные сенсоры с совместно иммобилизованными β -галактозооксидазой (ЕС 3.2.1.23) и глюкозооксидазой [5, 10].

18.2.1.9. Сахароза. Сахароза является важнейшим представителем дисахаридов. Она присутствует в различных пищевых продуктах и напитках для придания им сладкого вкуса или как исходный продукт брожения. Сахарозу получают из сахарного тростника или сахарной свеклы, в которых ее содержание обычно находится в пределах 15–25%. Надежное определение сахарозы требуется в производстве сахара, для контроля ферментационных процессов и качества пищевых продуктов.

До сих пор в основе действия всех ферментных электродов на сахарозу лежит катализируемый инвертазой (ЕС 3.2.26) гидролиз сахарозы и последующее окисление глюкозы с образованием электрохимически активных частиц [5, 27, 34]. Поскольку GOD превращает только β -форму глюкозы, соиммобилизация мутаротазы (ЕС 5.1.3.3), ускоряющей превращение исходно образующейся α -глюкозы в β -форму, приводит к почти десятикратному повышению чувствительности, так как в присутствии фермента скорость мутаротации выше, чем в случае спонтанной реакции. При этом, однако, во столько же раз сужается диапазон линейности сенсора [10, 58].

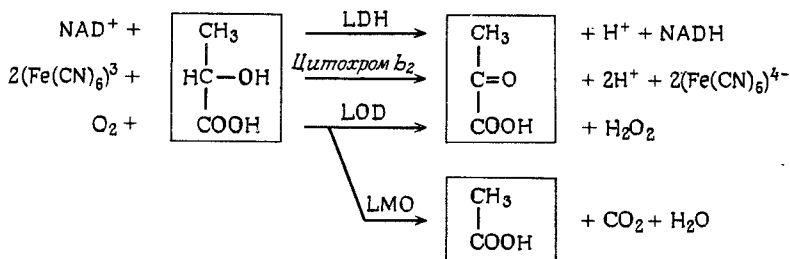
Методика определения сахарозы на анализаторе YSI та же, что и для глюкозы, за исключением того, что требуется установить мембрану с соиммобилизованными инвертазой, мутаротазой и глюкозооксидазой. Измерение длится около 60 с, что связано с необходимостью достижения стационарного состояния. Вклады раффинозы и мелибиозы в показания прибора составляют соответственно 2 и 8%. Диапазон линейности для сенсора простирается до 90 ммоль/л, обычный срок службы мембраны – 10 дней. Поскольку конечная ферментативная реакция здесь та же, что и при определении глюкозы, содержание последней в пробе влияет на результат определения сахарозы. Для таких проб фирма YSI рекомендует определять суммарное количество глюкозы и сахарозы и отдельно содержание глюкозы, используя «сахарозную» и просто «глюкозную» мембраны соответственно. Этот метод, очевидно, не очень удобен, поскольку требуется менять мембраны в ходе анализа. Более удобно проводить инверсию сахарозы вне измерительной ячейки, используя растворимую инвертазу и измеряя содержание глюкозы до и после этой процедуры.

Проблему влияния глюкозы на определение сахарозы можно решить, превратив глюкозу в другие, не мешающие продукты с помощью GOD и каталазы. С этой целью индикаторный ферментный слой покрывают защитным слоем, содержащим GOD и каталазу (ЕС 1.1.1.6). Проникающая в этот слой β -D-глюкоза полностью разлагается. При использовании защитного слоя на определение сахарозы не влияет эндогенная глюкоза, если ее концентрация в измерительной ячейке не превышает 2 ммоль/л [60].

Таким способом с помощью прибора *Glukometer* была непосредственно определена концентрация сахарозы в соке сахарной свеклы или растворимом какао [60]. Этот принцип используют и для устранения мешающего влияния других веществ, например лактата.

18.2.1.10. Лактат. У многих тяжело больных пациентов в результате дыхательных, гемодинамических и метаболических отклонений от нормы развивается ацидоз. Повышенное содержание лактата в плазме обычно связано с метаболическими нарушениями, приводящими к ацидозу, сопровождаемому, в частности, сосудистым коллапсом. Определение L-лактата в крови важно для того, чтобы отличить молочнокислый ацидоз от других случаев ацидоза, а также для последующего лечения. Специфической областью, в которой требуется быстрое и точное определение лактата в крови, является контроль за нагрузками спортсменов в спортивной медицине. Кроме того, определение концентрации лактата в цереброспинальной жидкости помогает отличить вирусный менингит от гнойного и установить церебральную кислородную недостаточность. Справочные значения концентрации лактата в крови и вытяжке составляют соответственно меньше 2,7 и 1,2–2,1 ммоль/л. Результаты определения лактата в сыворотке не отражают его истинной концентрации в крови, поскольку чем больше время между взятием пробы крови и выделением из нее форменных элементов, тем выше концентрация лактата в сыворотке.

Для определения L-лактата с помощью амперометрических биосенсоров пригодны четыре различных фермента: лактатдегидрогеназа (LDH, EC 1.1.1.27), цитохром b_2 (EC 1.1.1.23), лактатоксидаза (LOD, EC 1.1.3.2) и лактатмонооксигеназа (LMO, EC 1.13.12.4). Каталитические реакции, осуществляемые этими ферментами, можно представить следующей схемой:



Реакцию LDH можно сопрягать с редокс-электродами путем анодного окисления NADH либо непосредственно [6, 8, 31, 80], либо через электронные медиаторы, например феназинметосульфат [35] или флавиномононуклеотид [69]. Знакомство с этими сенсорами позволяет глубже проникнуть в проблемы регенерации электрохимически активного кофактора и медиаторного переноса электрона. Однако они непригодны для рутинного использования, прежде всего из-за загрязнения электрода продуктами окисления NADH или медиатора.

В биосенсорах на основе LMO (декарбокксилирующий фермент, часто называемый лактатоксидазой) иммобилизованный фермент закрепляют на поверхности кислородного электрода Кларка [36, 62]. Для такого сенсора авторы [36] получили линейную зависимость сигнала от концентрации при содержании лактата в измерительной ячейке до 0,25 ммоль/л. Для образцов реконструированных сывороток крови человека коэффициент корреляции между измеренными и истинными концентрациями $r = 0,995$ ($y = 1,094x - 0,128$ ммоль/л). Однако, как и во всех сенсорах на основе O_2 -электрода, могут возникать проблемы, связанные с разным содержанием кислорода в буферном растворе и исследуемом образце.

Реакция пиридиннуклеотид-независимой лактатдегидрогеназы (цитохром b_2) со-

прягается с амперометрическими электродами благодаря способности ферментов переносить электроны от лактата к некоторым медиаторам, включая тионин, ди-хлорфенол, индофенол и ферроцианид калия. Последний реагирует с наибольшей скоростью [28]. Используют также анодное окисление комплексов металлов с органическими соединениями, соиммобилизованных с ферментом и действующих как медиаторы [29] (гл. 15). Один из способов определения лактата *in vivo* заключается в том, что вместе с цитохромом b_2 иммобилизуют природный акцептор электрона, цитохром c , восстановленную форму которого затем определяют электрохимически [11]. Эти исследования пока еще не вышли за пределы лабораторий.

Система для определения лактата с помощью LOD включает иммобилизованный фермент в комбинации с датчиком, чувствительным к пероксиду водорода.

Автономные L-лактатанализаторы на основе ферментных электродов поставляются фирмами La Roche (Швейцария), OMRON Tateisi Electronics Co. (Япония) и Yellow Springs Instruments (США). В лактатанализаторе 640 фирмы La Roche, выпускаемом с 1976 г., используется сенсор с цитохромом b_2 , раствор которого просто помещают в реакционную камеру перед платиновым электродом, поляризуемым при +0,28 В для окисления ферроцианида. Этот прибор рассчитан на анализ 20–30 проб объемом 10 мкл в час при концентрации лактата в диапазоне 1–12 ммоль/л и погрешности 5%. Результаты получают через 2–3 мин после взятия крови у пациента. Сенсор, содержащий около 2 ед. активности фермента, стабильно работает в течение одного месяца. Коэффициент корреляции с данными оптического метода анализа с помощью LDH $r = 0,998$ ($y = 1,094x - 0,215$ ммоль/л).

В лактатанализаторах OMRON HER 100 и YSI модели 23L, выпускаемых с 1983 г., используют LOD-электроды. Первый из этих приборов позволяет определять до 8,9 ммоль/л лактата в крови при времени отклика 80 с и погрешности < 5%. Требуемый объем пробы 100 мкл. Температурная зависимость ферментативной реакции компенсируется встроенным термистором, находящимся в непосредственной близости от H_2O_2 -чувствительного датчика. LOD-сенсоры стабильно работают 13 дней, а коэффициент корреляции, полученный с контрольной пробой сыворотки, составляет 0,998 [75]. С помощью этого прибора определяют также лактат в клеточных культурах. Анализатор YSI 23L можно применять для определения лактата как в цельной крови, так и в плазме и в цереброспинальной жидкости. Коэффициенты корреляции с фотометрическим методом Бэрингера для этих трех объектов составляют соответственно 0,997, 0,997 и 0,9996. Линейность отклика сенсора сохраняется до 15 ммоль/л, причем требуется всего 25 мкл анализируемого раствора. Производительность прибора – 42 анализа в час.

Фирма Seres (Франция) предлагает анализатор Enzymat, частью которого является сенсор для определения D-изомера лактата, не имеющего, правда, медицинского значения. В этом приборе используется содержащий D-лактооксидазу клеточный экстракт и датчик, чувствительный к растворенному O_2 . Диапазон определяемых концентраций от 0,5 до 30 ммоль/л.

L-лактатный сенсор с иммобилизованной LOD успешно использовали [38] для исследований *in vivo* с искусственной поджелудочной железой (Biostator). Этот сенсор, помещаемый в потоке крови ниже по течению, чем глюкозный сенсор, позволяет следить за откликом организма больных диабетом на физическую нагрузку, вливание глюкозы или инсулина. Данный метод может быть полезен при разработке алгоритмов вливания в экстремальных случаях, например при хирургических операциях больных диабетом.

Значительный интерес представляет новый принцип определения L-лактата, положенный в основу прибора Glukometer. Использование системы, рециркулирующей лактат-пируват, которая состоит из LDH и цитохрома b_2 , позволило повысить

чувствительность сенсора к лактату по меньшей мере на порядок [63]. Для определения лактата с помощью этого сенсора требуется всего 1 мкл крови. Введение защитной мембраны с LMO (для окисления эндогенного лактата крови до не мешающих определению ацетата и CO_2) делает сенсор пригодным для быстрого определения активности аланинаминотрансферазы [66].

18.2.1.11. Мочевина. Концентрация мочевины в крови, обычно выражаемая как концентрация остаточного азота крови, является важным параметром при клинических исследованиях, поскольку это показатель функции почки. Нормальное значение этой величины составляет 3,6–8,9 ммоль/л.

Амперометрические методы определения мочевины были разработаны значительно позже, чем потенциометрические и кондуктометрические. Первый амперометрический мочевиновый электрод, разработанный группой Сузуки в Японии, состоял из комбинации уреазной мембраны с нитрифицирующими бактериями, которые метаболически продуцируют аммиак и расходуют кислород (гл. 2). Расход кислорода измеряют, используя датчик типа электрода Кларка [48]. Описываемый сенсор содержит пять мембран и поэтому имеет относительно большое время отклика – 2 мин для скоростных анализов или 7 мин для стационарных измерений. Характеристики сенсора вполне удовлетворительны: отсутствует влияние буферного раствора; коэффициент корреляции с оптическим методом равен 0,97; стабильно работает в течение 10 дней; сигнал линейно зависит от концентрации в диапазоне от 2 до 200 ммоль/л. Однако из-за большого объема анализируемого раствора (50 мл) при высоких концентрациях и значительном разбросе показаний (коэффициент вариации равен 5% при концентрации 150 ммоль/л) этот метод применим только для анализа мочи.

В работе [25] предложен еще один вариант амперометрического определения мочевины, основанный на pH-зависимости окисления гидразина. Достоинствами этого метода являются линейная градуировочная кривая (в отличие от логарифмической характеристики потенциометрических сенсоров, рис. 18.3), превосходная воспроизводимость (коэффициент вариации 1%), высокая производительность (40 проб в час в режиме скоростного анализа) и широкий диапазон линейной зависимости сигнала от концентрации – от 0,025 до 2 ммоль/л (концентрация 1–80 ммоль/л при объеме пробы

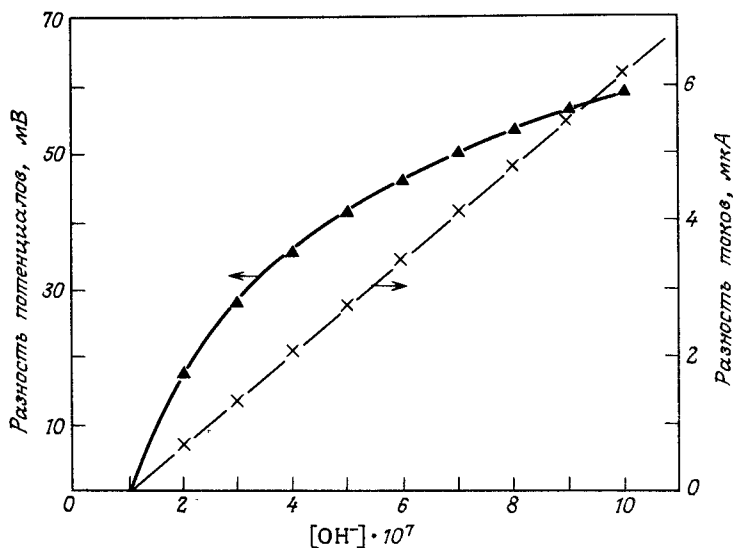


Рис. 18.3. Градуировочные кривые амперометрического и потенциометрического pH-датчика.

50 мкл). Чувствительность метода составляет $75 \text{ нА} \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{л}$, тогда как с описанным выше гибридным мочевиным сенсором достигается всего лишь $4,4 \text{ нА} \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{л}$. Однако на результаты, получаемые этим рН-чувствительным методом, влияют многие соединения, например белки или кислые карбонаты, определяющие рН и буферную емкость биологических жидкостей.

18.2.1.12. Креатинин и креатин. Определение креатинина и креатина в биологических жидкостях имеет важное значение для диагностики заболеваний почек, щитовидной железы и мышц. Нормальные концентрации этих соединений составляют около 100 мкмоль/л .

В работе [74] описано два типа амперометрических многоферментных электродов для определения креатинина и креатина. На асимметричные ацетилцеллюлозные мембраны, селективно проницаемые для пероксида водорода, наносят соиммобилизованные креатининамидогидролазу (СА, ЕС 3.5.2.10); креатинамидиногидролазу (СІ, ЕС 3.5.3.3) и саркозиноксидазу (СО, ЕС 1.5.3.1) или только СІ и СО (в случае креатина). Конечным продуктом, определяемым амперометрически, является пероксид водорода. Оба электрода дают линейный отклик до концентрации субстратов 760 мкмоль/л . Время отклика составляет всего 20 с (в скоростном режиме), а предел обнаружения равен $7,6 \text{ мкмоль/л}$. Требуемый объем пробы — 25 мкл, чувствительность — $11 \text{ нА} \cdot \text{ммоль}^{-1} \cdot \text{л}$. В течение одного дня результаты измерений воспроизводятся с коэффициентом корреляции от 1,3 до 11,7% для креатинина и от 4,8 до 7,6% для креатина. Корреляция результатов анализа сыворотки этим методом и оптическим методом Джафе характеризуется следующим образом: для креатинина $y = 1,078x - 23,0 \text{ мкмоль/л}$, $r = 0,985$; для креатина $y = 1,101x - 19,0 \text{ мкмоль/л}$, $r = 0,962$. За 11 дней теряется менее 20% активности.

18.2.1.13. Мочевая кислота. Значение количественного определения мочевой кислоты для диагностики и лечения гематологических болезней общепризнано. В норме концентрация мочевой кислоты в крови лежит в диапазоне $140\text{--}420 \text{ мкмоль/л}$.

В присутствии уриказы (уратоксидаза, ЕС 1.7.3.3) мочевая кислота окисляется молекулярным кислородом по реакции



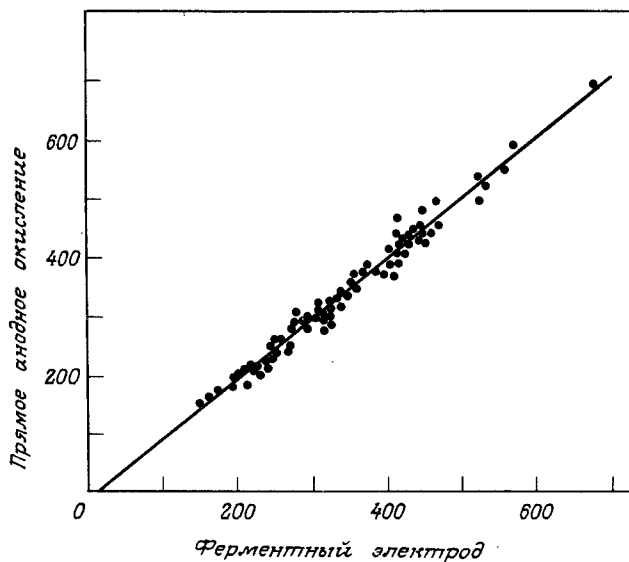
Первый амперометрический метод количественного определения мочевой кислоты в биологических жидкостях был описан Наньо и Гилболтом [45]. Эти авторы измеряли уменьшение концентрации растворенного кислорода, поскольку они не могли различать сигналы H_2O_2 и непрореагировавшей мочевой кислоты. В последующих работах других авторов были предложены электроды на мочевую кислоту, в которых H_2O_2 и/или мочевую кислоту подвергали электроокислению. Сводка этих результатов дана в табл. 18.2. В работе [19] проведено сравнение различных режимов функционирования (нестационарных и стационарных) кислород- и H_2O_2 -чувствительных электродов с прямым электрохимическим окислением мочевой кислоты (рис. 18.4). Кулис и др. [30] сумели устранить мешающее влияние других электрохимически активных компонентов биологических проб (например, аскорбиновой кислоты), используя пероксиду хрома как катализатор реакции между H_2O_2 и гексацианоферратом (II) с последующим восстановлением комплекса Fe(III) на стеклоуглероде при потенциале 0 В относительно Ag/AgCl -электрода. В работе [82] уриказу сопрягали с избирательно проницаемой для H_2O_2 мембраной — схема, которая используется в серийно выпускаемом анализаторе мочевой кислоты UA 300 A (Fuji Electric, Япония). Аналогичные результаты получены и на варианте Glukometer GKM [19].

18.2.1.14. Этанол. Это токсическое вещество встречается в судебной практике чаще всего. Для установления факта управления автомобилем в нетрезвом состоянии и в случае острого алкогольного отравления требуется быстро и точно определить

Таблица 18.2. Уриказные электроды

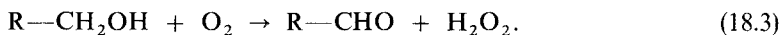
Определяемый компонент	Объем пробы, мкл	Верхняя граница диапазона линейности, ммоль	Стабильность работы	Погрешность, %	Корреляция с данными оптических методов $y = ax + b$; r			Литература
					a	b , (ммоль/л)	r	
O ₂	500	0,5	Через 100 дней 70% начальной активности	9	0,96	0,049	1,02	[45]
[Fe(CN) ₆] ³⁻ (через пероксидазу хрена)	10	0,035	Через 40 дней 50% начальной активности	4	0,97	0,357	1,0	[28]
O ₂	100	1,2	7 дней	3,2-4,8	—	—	—	[19]
H ₂ O ₂	100	1,2		1,8-2,0	0,943	0,0198	0,9948	
H ₂ O ₂	20	0,6	500 измерений	0,5-2,7	1,10	0,00244	0,974	[82]
H ₂ O ₂	25	3,0	17 дней (1000 измерений)	0,6-2,2	0,977	0,003	0,985	[74]

Рис. 18.4. Корреляция между концентрациями мочевой кислоты (мкмоль/л), определенными с помощью прямого анодного окисления (y) и уриказного ферментного электрода (x); $y = 1,018x + 12,5$ мкмоль/л; $r = 0,9921$.



содержание этанола в крови. Определение концентрации этанола играет также большую роль в контроле качества пищевых продуктов и напитков и ферментационных процессов.

До сих пор попытки использовать амперометрические биосенсоры на основе алкогольдегидрогеназы [6, 35] для анализа «реальных» проб были безуспешны. Напротив, алкогольоксидаза (ЕС 1.1.3.13) из различных микробных источников, видимо, вполне пригодна для сенсоров, чувствительных к спирту. Этот фермент катализирует окисление низкомолекулярных первичных спиртов по реакции



В работе [17] находили содержание добавленного к пробам крови этанола с помощью ферментного сенсора на основе O_2 -электрода, используя коммерческие препараты алкогольоксидазы из *Candida boidinii*. Отклонение результатов от полученных методом газовой хроматографии составило всего 2,5%. Сенсор на основе алкогольоксидазы использовали также в проточной системе для определения этанола в пиве [61]. Отклик сенсора линейно зависел от концентрации этанола до 30 ммоль/л, половина срока службы составляла 6,5 дней, частота измерений 60 анализов в час. Эта система позволяет довольно точно определять этанол в пиве.

Используя алкогольоксидазу из *Hansenula polymorpha* совместно с каталазой, авторы [76] разработали сенсор для прямого и непрерывного определения этанола при ферментационных процессах. Парциальное давление растворенного кислорода в ферментере поддерживали на уровне 95–100% путем интенсивного перемешивания и аэрации. В бродильном бульоне электрод стабильно работал только 3–5 дней, тогда как в буферном растворе его можно использовать несколько недель. Еще одним недостатком метода является узкий диапазон концентраций субстрата (до 1 ммоль/л), при которых получается линейный отклик. Поэтому в процессе брожения за образованием этанола можно следить только в течение короткого времени. Тем не менее этот сенсор позволяет быстро оценивать ферментативную способность аэробных дрожжевых культур.

Определение алкоголя возможно и при помощи серийно выпускаемого анализатора

YSI модели 27. В этом приборе алькоголюксидазная мембрана помещается между поликарбонатной и ацетилцеллюлозной мембранами. Срок службы сенсора — семь дней. Этот прибор позволяет с хорошей точностью определять содержание этанола в напитках [39] в концентрации до 94 ммоль/л. Погрешность воспроизводимости меньше 2%. На результаты измерений сильное влияние оказывает метанол, однако он редко встречается в обычно исследуемых этанольных растворах.

18.2.1.15. Глутамат, лизин. Изучено большое число амперометрических биосенсоров аминокислот, в которых используются либо неспецифические, либо высокоселективные аминокислотные оксидазы. На них только сенсоры глутамата и L-лизина, вероятно, применимы в рутинном анализе. В лизиновом электроде используют высокоселективную L-лизин- α -оксидазу (EC 1.4.3.) из *Trichoderma viride*, иммобилизованную в желатиновом слое на O₂-электроде [56]. Свойства носителя позволяют минимизировать влияние кислорода в пробе. Диапазон линейности сигнала сенсора узок, однако аппроксимация градуировочной кривой и использование микрокомпьютера позволяют работать в области концентрации от 0,2 до 3 ммоль/л. При кинетических измерениях инактивация фермента в ходе реакции минимальна, так что с одной лизиноксидазной мембраной можно выполнить 3000 анализов. Описанный лизиновый сенсор используют в проточной системе; его можно также применять для контроля ферментационных процессов. Этот сенсор используется в анализаторе Enzymat фирмы Seres (Франция).

В работе [79] предложен L-глутаматный сенсор, в котором используется выделенный недавно фермент L-глутаматоксидаза (EC 1.4.3.11) (см. также раздел 18.2.4.2). Этим сенсором с хорошей точностью определяется глутамат в соевом соусе (коэффициент корреляции с L-глутаматдекарбоксилазным методом $r = 0,978$).

18.2.1.16. Изоцитрат. Это вещество является побочным продуктом микробиологического производства лимонной кислоты. Высокая концентрация изоцитрата в ферментационных бульонах может приводить к уменьшению выхода кристаллической лимонной кислоты. Его содержание зависит как от штамма микроорганизма, так и от условий проведения процесса. Поэтому аналитический контроль изоцитрата в процессе производства может быть весьма полезен.

Изоцитрат подвергается окислительному декарбоксилированию изоцитратдегидрогеназой (IDH, EC 1.1.1.42), которая представляет собой NADP⁺-зависимый фермент (рис. 18.5). Авторы [44] иммобилизовали этот фермент на поверхности электрода вместе с медиатором, однако результаты амперометрического определения были неудовлетворительными. Более удачной оказалась система, в которой расход кислорода при каталитическом реокислении NADPH измеряли при помощи электрода Кларка. С этой целью IDH иммобилизовали вместе с пероксидазой хрена (HRP, EC 1.11.1.17). Такой биферментный электрод использовали для определения изоцитрата в его чистых растворах [65]. Исползованию электрода в ферментационных растворах препятствуют помехи со стороны других компонентов пробы. Поэтому HRP заменяют феназинметосульфатом (PMS) в растворимой форме [24] или иммобилизованным вместе с IDH (см. рис. 18.5). Во всех случаях кофактор добавляют в фоновый раствор, и, таким образом, он проникает в ферментный слой еще до введения изоцитрата.

18.2.1.17. Фосфат. Определение фосфата в крови и моче важно для диагностики почечной недостаточности, нехватки витамина D, гипervитаминоза, костных заболеваний, диабетического кетоацидоза и других нарушений. Определение фосфора представляет интерес также для агрохимии и защиты окружающей среды, поскольку он содержится в удобрениях и детергентах.

Еще в 1975 г. в работе [16] было предложено в биосенсоре фосфат-иона использовать комбинацию ингибируемого фосфатом фермента, щелочной фосфатазы, и GOD. Аналогичный подход использовали при создании фосфатного сенсора, который легко

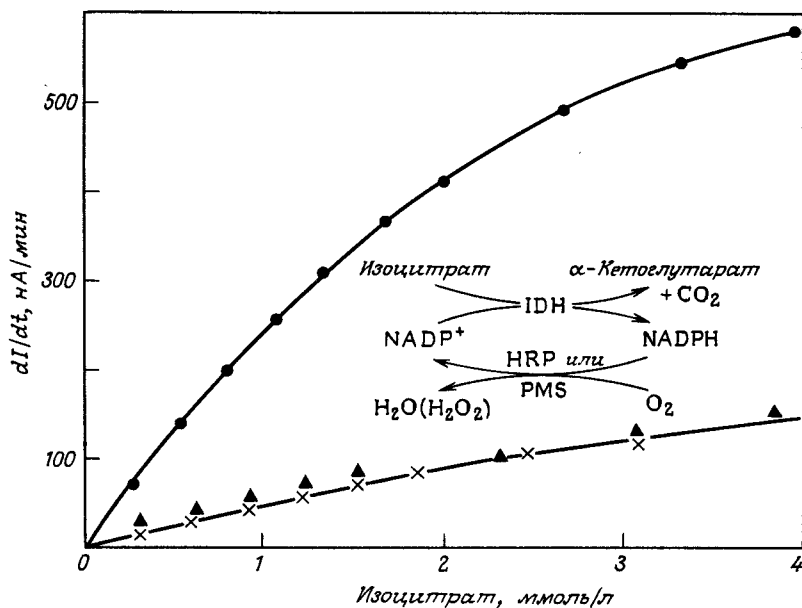


Рис. 18.5. Схема и градуировочные кривые для амперометрического определения изоцитрата с изоцитратдегидрогеназным (IDH) мембранным электродом. Рециклирование кофактора: растворимым PMS (x); иммобилизованным PMS (▲); иммобилизованной HRP (и растворимыми сокатализаторами) (●).

можно использовать в Glukometer [64]: срез ткани картофеля, содержащий кислотную фосфатазу (EC 3.1.3.2), иммобилизовали на слое GOD, нанесенном на кислородный электрод. Присутствующий в фоновом буферном растворе глюкозо-6-фосфат гидролизует кислотная фосфатаза, а на образующуюся при этом глюкозу сенсор дает стабильный отклик. Добавление ингибитора фосфатазы, неорганического фосфата, вызывает изменение сигнала, соответствующее уменьшению высвобождения глюкозы. Этот гибридный сенсор на основе растительной ткани позволяет определять концентрацию фосфата в диапазоне от 1 до 30 ммоль/л при объеме пробы 100 мкл. Сенсор сохраняет стабильность при проведении 300 анализов или в течение трех недель; погрешность определения не превышает 2%; производительность анализа 15 проб. Из четырнадцати испытанных веществ мешают только тетраборат и молибдат и в меньшей степени — борат и нитрат. Фосфат определяют с хорошей точностью в моче и растворах удобрений. Однако для определения фосфора в крови, в которой его нормальная концентрация составляет 0,5–1,8 ммоль/л, чувствительность сенсора недостаточна.

18.2.2. Низкомолекулярные поверхностно-активные вещества

Для органических веществ, молекулы которых имеют как гидрофобную, так и гидрофильную часть, характерна тенденция к образованию мицелл. Это особенно свойственно различным липидам и эфирам холестерина. Чтобы предотвратить образование мицелл и получить молекулярно-дисперсные растворы, в исследуемые биологические жидкости добавляют детергенты. Последние, однако, изменяют растворимость кислорода, тем самым влияя на результаты измерения потребления кисло-

рода. Дeterгенты могут также накапливаться на мембранах электрода, что приводит к изменению скорости массопереноса.

Вместе с плазматическими фосфолипидами и триглицеридами холестерин переносится в потоке крови, будучи связан со специфическими белками. Эти липопротеины можно представить в виде сферических частиц с внешним солюбилизирующим покрытием из белков и фосфолипидов, а внутри с гидрофобной нейтральной сердцевиной из триглицерида и холестерина. Нейтральные липиды (триглицериды), фосфолипиды и сложные эфиры холестерина расщепляются специфическими гидролазами с образованием субстрата соответствующей оксидазы. По рассмотренным выше причинам гидролитические реакции, катализируемые растворимым ферментом, проводят отдельно от концентрационных измерений, выполняемых амперометрическим оксидазным электродом.

18.2.2.1. Холестерин. Сегодня все озабочены проблемой холестерина, поскольку существует явная связь между его концентрацией в плазме крови и сердечно-сосудистыми заболеваниями: с увеличением содержания холестерина число сердечных приступов возрастает [32]. Для «нормального» мужчины или женщины среднего возраста содержание холестерина в плазме в среднем составляет 3,1–6,7 ммоль/л, причем 70% всего холестерина существует в виде эфиров жирных кислот.

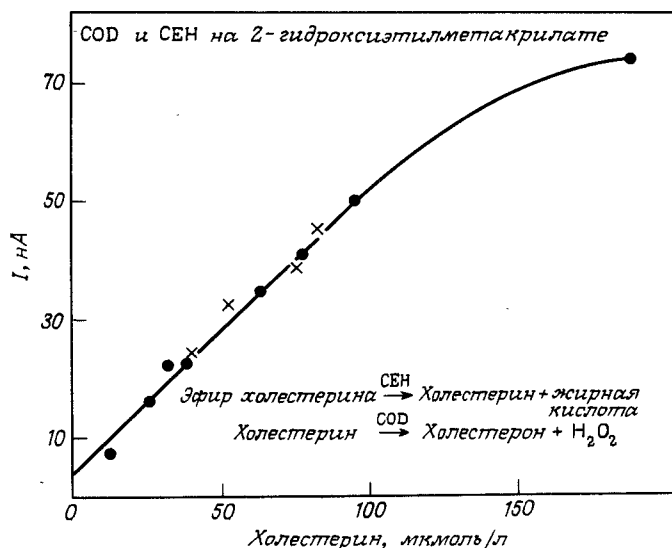
В разработанных несколькими группами исследователей [4, 37, 57] ферментных электродах для определения свободного холестерина использовали холестериноксидазу (COD, ЕС 1.1.3.6), иммобилизованную на поверхности коллагеновой мембраны или на нейлоновой сетке. Концентрацию свободного холестерина определяли с погрешностью 5–25%. Для определения общей концентрации холестерина сыворотку выдерживают в растворе Тритон X-100 или дезоксихолатсодержащих растворах с добавкой гидролазы эфиров холестерина (СЕН, ЕС 3.1.1.13). Ту же реакционную схему используют в липидном анализаторе ICA-LG 400 фирмы Тою Jozo (Япония). Для получения свободного холестерина пробу сыворотки (30 мкл) предварительно обрабатывают 7,5 мкл раствора СЕН в течение 11 мин при 37 °С. Концентрацию холестерина находят с помощью COD, иммобилизованной на кислородном электроде. Быстрый отклик электрода (всего 15 с) обусловлен использованием скоростного метода измерения расхода кислорода. В получаемую величину вносят поправку на сигнал кислородного датчика без фермента. Одновременно с холестерином определяют также концентрацию триглицеридов и фосфолипидов (см. ниже). Производительность анализатора – 40 проб в час. Аскорбиновая кислота и билирубин не мешают определению. Уравнение корреляции с данными неспецифического стандартного метода анализа для общего содержания холестерина имеет вид $y = 1,03x - 0,15$ ммоль/л; $r = 0,985$ ($n = 50$).

В работе [78] описан ферментный электрод, COD и СЕН в котором непосредственно контактируют, будучи иммобилизованы на поверхности сферических частиц. Этот электрод позволяет определять с одинаковой чувствительностью как свободный холестерин, так и его сложные эфиры (рис. 18.6), что свидетельствует о полном гидролизе эфиров. При использовании H_2O_2 -электрода, работающего в стационарном режиме, определение общего содержания холестерина в пробе сыворотки объемом 50 мкл занимает 5 мин. Этот двухферментный сенсор, однако, стабилен всего лишь в течение дня.

18.2.2.2. Триглицериды. Анализ на сывороточные триглицериды является решающим тестом при диагностике и классификации гиперлипидемии. Гиперлипидемия, известная прежде всего как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний, ассоциируется и с многими другими болезнями. Нормальная концентрация триглицеридов в сыворотке крови составляет 0,35–1,7 ммоль/л.

При определении триглицеридов их прежде всего подвергают каталитическому

Рис. 18.6. Градуировочный график для определения общего содержания холестерина в водных стандартных растворах (●) и растворах сыворотки (×) при помощи СЕН/COD-электрода.



расщеплению микробной липопротеинлипазой (ЕС 3.1.1.3). При этом образуется глицерин и жирные кислоты. В последующих реакциях глицерин превращается в легко детектируемое вещество. При амперометрическом определении триглицеридов используют растворимую или иммобилизованную глицериндегидрогеназу (ЕС 1.1.1.6), сопряженную с катализируемым диафоразой превращением NADH [22, 27]. С другой стороны, в анализаторе липидов ICA-LG 400 (фирмы Тоуо Жоу, Япония) используют глицеринкиназу (ЕС 2.7.1.30) и глицерофосфатоксидазу (ЕС 1.1.3.-), оценивая скорость потребления кислорода так же, как при определении холестерина. За один час можно проанализировать 40 проб сыворотки. Возможность использования глицериноксидазы привела бы к существенному упрощению этой реакционной системы.

18.2.2.3. Фосфолипиды. Нормальная концентрация фосфолипидов в плазме крови лежит в диапазоне от 2,5 до 3,0 ммоль/л. Основным компонентом является фосфатидилхолин. При ферментативном определении фосфолипидов используют комбинацию фосфолипазы D (ЕС 3.1.4.4) и холиноксидазы (ЕС 1.1.99.1). В анализаторе ICA-LGA 400 фирмы Тоуо Жоу пробу сыворотки предварительно обрабатывают растворимой фосфолипазой D и затем с помощью амперометрического оксидантного электрода находят концентрацию свободного холина.

В работе [21] пероксид водорода, образуемый в ферментном реакторе, определяют электрохимически с помощью ферментов, соиммобилизованных в гидрофобном агарозном геле. Время отклика прибора с проточным ферментным реактором составляет 2 мин, а диапазон линейности отклика — от 0 до 4 ммоль/л.

18.2.3. Высокмолекулярные растворимые вещества

Известны два способа определения ферментативно неактивных водорастворимых высокомолекулярных веществ при помощи амперометрических биосенсоров:

1) Их можно расщепить на части, достаточно малые для прохождения через мембраны, покрывающие иммобилизованный ферментный слой, где они превращаются в электрохимически активные продукты.

2) Их можно определять с помощью иммунологических реакций, если имеются соответствующие антитела или антигены. Предложены потенциометрические био-

сенсоры, в которых непосредственно регистрируют изменения плотности заряда в результате специфического комплексообразования между каким-либо биологически активным и определяемым высокомолекулярным веществом.

18.2.3.1. Полисахариды. Наиболее распространенным углеводом является целлюлоза, представляющая собой полимер глюкозы, связанной 1,4-β-гликозидными связями. Ежегодное мировое потребление глюкозы оценивается в 800 млн тонн. Еще один полимер, образуемый из глюкозы, – это крахмал, в котором остатки глюкозы связаны в основную цепь 1,4-α-гликозидными связями. Новый продукт биотехнологии – пуллулан – представляет собой линейный полисахарид, содержащий связанные 1,6-α-гликозидными связями остатки мальтотриоз.

Перед анализом полисахариды гидролизуют в кислой среде до глюкозы или расщепляют специфическими ферментами, например целлюлозами, амилазами или пуллулазами.

18.2.3.2. Крахмал. Серийный анализатор YSI модели 27 снабжен глюкозооксидазной мембраной, которую после специальной обработки нетрудно приспособить для определения крахмала. При определении крахмала используют два подхода:

1) Для гидролиза крахмала в анализаторе вводят в рабочий раствор постоянное количество глюкоамилазы и после установления равновесия добавляют пробу крахмала. Через 60 с считывают с дисплея количество глюкозы, полученное при гидролизе крахмала.

2) Для внешнего гидролиза крахмала используют глюкоамилазу, одну или вместе с α-амилазой (ЕС 3.2.1.1); затем определяют содержание глюкозы крахмала после гидролиза. Этим методом определяют крахмал не только в кукурузе, рисе, пшенице, картофеле, но и в различных продуктах из них – кукурузной муке, хлопьях для завтрака, блинной муке. Диапазон определяемых концентраций составляет от 0 до 25 ммоль/л с воспроизводимостью ±2%.

Более изящный и экономичный подход заключается в соиммобилизации глюкозооксидазы и глюкоамилазы для определения сахаридов, проникающих через защитную диализную мембрану, расположенную перед биферментным слоем. Используя глюкоамилаза-глюкооксидазный электрод, с помощью Glukometer GKM 01 непосредственно определяют крахмал в течение 0,5–1 мин при диапазоне линейности до 0,3% (конечная концентрация) [54]. Перед измерением в рабочий раствор вводят постоянное количество (1 ед. активности) α-амилазы (рис. 18.7). Проблему мешающего влияния эндогенной глюкозы решили, покрыв глюкоамилаза-глюкозооксидазный электрод защитным ферментным слоем, содержащим глюкозооксидазу и каталазу (рис. 18.7) (см. также раздел 18.2.1.9).

При помощи Glukometer GKM 01 с глюкоамилаза-глюкозооксидажной мембраной на модифицированном кислородном электроде можно определять также концентрацию пуллулана (конечная концентрация до 0,1%) [53]. При этом в рабочий раствор добавляют постоянное количество (2 ед. активности/мл) растворимой пуллулазы. Анализатор использовали и для определения растворимой целлюлозы. В этом случае в рабочий раствор вводили постоянное количество целлюлозы (ЕС 3.2.1.4) и регистрировали количество образуемой при гидролизе глюкозы [51].

18.2.3.3. Антигены и антитела. До сих пор не описано каких-либо серийных биосенсорных систем для определения антигенов и антител. В разработанных недавно ферментных иммуносенсорах измеряют активность ферментов-маркеров, связанных с определенным количеством антигена. Содержащий маркер антиген и немеченый определяемый антиген конкурируют между собой за связывание с определенными сайтами антител на мембране, покрывающей электрод. Неизвестная концентрация немеченого антигена обратно пропорциональна измеряемой электродом активности фермента-маркера. Однако в настоящее время чувствительность этого метода низка по

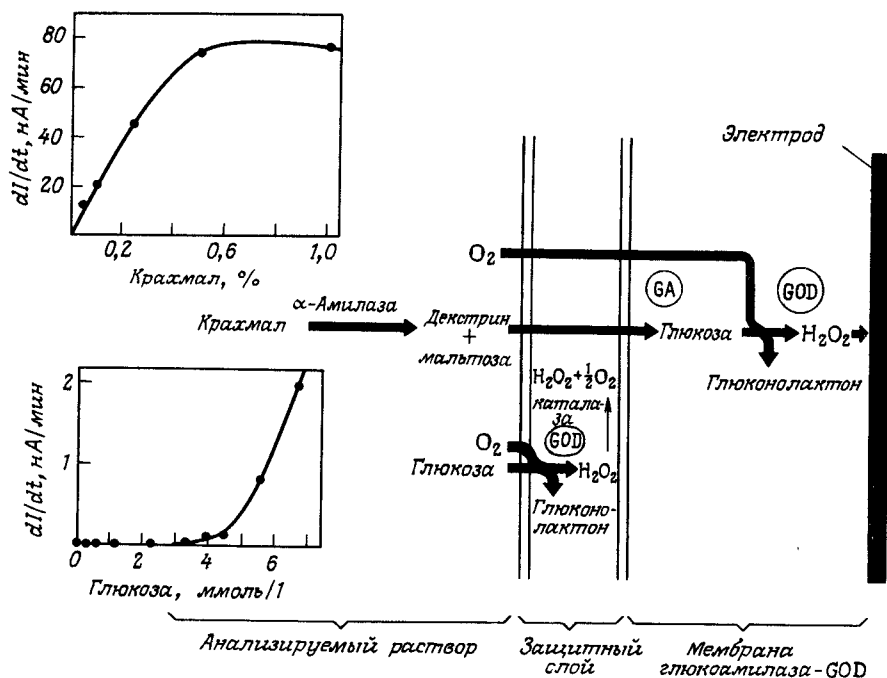


Рис. 18.7. Принципиальная схема определения крахмала с помощью многослойного сенсора с защитным слоем, устраняющим влияние глюкозы.

сравнению с хорошо отработанными методами иммуноферментного анализа. Кроме того, невозможно провести измерения быстро, поскольку измерительная ячейка занята в течение всего инкубационного периода (до нескольких часов), необходимого, чтобы образовался комплекс антиген-антитело.

В настоящее время, по-видимому, единственный практический способ устранения этих недостатков — это разработка методов электрохимического иммуноферментного анализа, как потенциометрических, так и амперометрических. Образование комплекса антиген-антитело проводят вне сенсорной системы. После завершения инкубационного периода добавляют субстрат фермента-маркера и с помощью сенсора следят за скоростью превращения субстрата, используя щелочную фосфатазу в качестве фермента-маркера, глюкозо-6-фосфат как субстрат и сенсор глюкозы. При помощи *Glukometer* можно определить от 1,6 до 16 нг фактора VIII, связанного с антигеном в плазме крови человека [52].

Амперометрическое детектирование супероксид-аниона, образующегося при взаимодействии нейтрофилов с абсорбированным на поверхности электрода IgG, открывает, по-видимому, новые возможности для создания иммуноэлектродов более прямого действия ([14]; см. также гл. 4).

18.2.4. Активность ферментов

Определение активности ферментов в физиологических жидкостях является быстро развивающейся областью клинической диагностики. Повышенная ферментативная активность, обнаруживаемая в крови, сыворотке, плазме или моче, свидетельствует об утечке ферментов из поврежденных тканей и клеток. При контроле ферментационных

процессов большое значение имеет измерение активности промышленных ферментов, например протеаз или амилаз. Принцип действия сенсоров для определения активности ферментов состоит главным образом в измерении начальной скорости превращения субстрата исследуемым ферментом, который добавляют в рабочий раствор, насыщенный субстратом. Высокая концентрация субстрата необходима, чтобы протекала реакция нулевого порядка, для которой скорость превращения субстрата зависит только от активности фермента. В настоящее время серийно выпускается только один автономный ферментный сенсор, предназначенный для определения α -амилазы (фирма Fuji Electric, Япония).

18.2.4.1. Лактатдегидрогеназа. Лактатдегидрогеназа (LDH) представляет собой тетрамер, образующий пять изоферментов, которые различаются по структуре субъединиц и электрофоретической подвижности. В клетках млекопитающих LDH локализована только в цитоплазме и при повреждении клеток (заболеваниях печени и сердца) легко из нее высвобождается. Общая активность LDH в сыворотке имеет важное клиническое значение при диагностике различных заболеваний, таких, как острый инфаркт миокарда, застойные болезни сердца, злокачественное малокровие и гепатит. Нормальные содержания LDH в сыворотке крови взрослых мужчин и женщин находятся в пределах 63–155 и 62–131 ед. активности/л соответственно.

С помощью сенсора на основе пируватоксидазы (EC 1.2.3.3), работающего по принципу максимального уменьшения тока, определили активность LDH в сыворотке крови человека в пределах 25–135 ед. активности/л [40]. Предложенный в работе [41] сенсор с иммобилизованной лактатооксидазой позволяет последовательно определять лактат и LDH. Минимальная определяемая активность LDH составляет 1 ед. активности/л. Для десяти последовательных измерений относительное стандартное отклонение равно 2,6%. Общая продолжительность измерения активности LDH 5 мин. Если проводить десять измерений в день, сенсор работает стабильно в течение двух недель. При определении активности LDH в сыворотке в диапазоне от 138 до 414 ед. активности/л коэффициент корреляции с данными обычного метода составляет 0,995.

Автономные LDH-анализаторы до сих пор неизвестны. Однако L-лактатанализаторы фирм La Roche, OMRON, Yellow Springs Instruments Corp., а также Glukometer нетрудно приспособить для измерения активности LDH (см. также раздел 18.2.1.10). Правда, могут возникнуть проблемы, связанные с присутствием лактата в сыворотке и с тем, что в катализируемой LDH реакции образуются относительно малые количества лактата, поэтому может потребоваться стадия предварительной инкубации.

18.2.4.2. Амилазы. Амилазы катализируют гидролиз олигосахаридов и полисахаридов (крахмал и гликоген). α -Амилаза дает главным образом мальтозу и некоторые другие олигосахариды (4–12 глюкозных остатков). Определение α -амилазы в крови и моче имеет решающее значение при диагностике острых панкреатитов. В норме активность α -амилазы в сыворотке находится в пределах от 60 до 150 ед. активности/л.

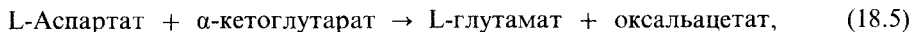
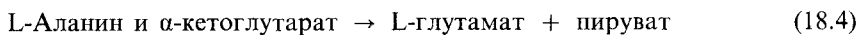
Для определения активности α -амилазы в сыворотке применяют различные биосенсорные системы. В серийном анализаторе фирмы Fuji Electric [50] используется GOD-сенсор, при помощи которого находят сначала концентрацию эндогенной глюкозы в анализируемой пробе и затем после добавления мальтопентаозы и фиксированного количества α -глюкозидазы (мальтазы, EC 3.2.1.20), определяют активность α -амилазы. Однако стоимость анализа довольно велика из-за большого расхода растворимого фермента и специально приготовленного субстрата. Кроме того, метод дает неверные результаты при высокой концентрации эндогенной глюкозы. Более эффективный подход, по-видимому, заключается в использовании биферментных сенсоров с соиммобилизованными GOD и глюкоамилазой [51] или α -глюкозидазой [81]. В обоих случаях мальтозы и олигосахариды, образующиеся при катализируемом α -амилазой гидролизе крахмала, диффундируют в биферментную мембрану, где под

действием глюкоамилазы или α -глюкозидазы превращаются в глюкозу, которую и определяют по реакции с GOD. Активность α -амилазы в сыворотке крови человека можно определять глюкозоанализатором 23 А фирмы Yellow Springs Instruments, поместив на его электрод мембрану с ферментной системой α -глюкозидаза-GOD. Через 30 с после введения 25 мкл сыворотки в фосфатном буферном растворе, содержащем 0,1% растворимого крахмала, в течение 30 с регистрируют увеличение тока. Общая продолжительность анализа 100 с. При анализе трех различных проб сыворотки ($n = 20$) в течение одного дня погрешность составляет от 4,4 до 7,3%. Результаты повторных анализов контрольных проб сыворотки в течение 17 дней варьировали в пределах 5%. После 1000 анализов за этот же период сохранялось 70% от начальной активности сенсора.

При помощи Glukometer GKM 01 с биферментным сенсором (глюкоамилаза и GOD) измеряли активность α -амилазы бактериального происхождения. Градуировочный график для этой системы линеен до 4,0 ед. активности α -амилазы в рабочем растворе [54]. С помощью этого же биферментного сенсора определяли активность пуллулаказы [53]. При фиксированном содержании пуллулана (0,1%) в рабочем растворе максимальный наклон кривой ток-время линейно зависит от активности пуллулаказы до 0,7 ед. активности/мл. Предел обнаружения составляет 0,05 ед. активности/мл.

18.2.4.3. Аминотрансферазы. Определение активности аланин- и аспартатамино-трансферазы (ALT, ЕС 2.6.1.2 и AST, ЕС 2.6.1.1; раньше их обозначали как GPT и GOT) немногим менее важно, чем определение глюкозы. Повышенная активность этих ферментов в сыворотке является признаком миокардита и гепатита (желтухи). Все эти болезни становятся все более распространенными в промышленно развитых странах. Нормальные значения активности ALT и AST составляют 5–24 и 5–20 ед. активности соответственно. Они могут увеличиваться в 100–1000 раз, особенно при остром гепатите и алкоголизме. Поэтому для биосенсоров, предназначенных для измерения активности этих ферментов, желателен широкий диапазон определяемых содержаний.

Судя по реакциям, катализируемым ALT (уравнение 18.4) и AST (уравнение (18.5):



возможна регистрация с помощью биосенсоров продуктов этих реакций, глутамата, пирувата и оксальацетата. Для последовательного определения обеих аминотрансфераз в работе [23] применили биферментный электрод, включающий адсорбированную на поливинилхлориде оксальацетатдекарбоксилазу (ЕС 4.1.1.3) и пируватоксидазу (ЕС 1.2.3.3). Базовым датчиком служил электрод, чувствительный к пероксиду водорода. Сначала определяют активность AST, добавляя пробу в рабочий раствор, содержащий аспартат и α -кетоглутарат. Активность AST оценивают по наклону кривой ток-время. Затем добавляют раствор субстрата, содержащий аланин, и регистрируют дальнейшее увеличение наклона кривой. Разность этих двух наклонов линейно связана с активностью ALT. Для обоих ферментов верхняя граница диапазона определяемых содержаний доходит до 1500 ед. активности/л. Продолжительность определения активности ферментов не превышает 4 мин. Коэффициент корреляции результатов, полученных при помощи сенсора и спектрофотометрическим методом, рассчитанный по данным анализа 25 проб сыворотки, составляет 0,99 как для ALT, так и для AST.

Еще один столь же многообещающий подход связан с использованием L-глутаматоксидазы. Этот недавно выделенный флавопротеин селективно катализирует окислительное деаминирование аминокислоты с образованием NH_3 , α -кетоглутарата и H_2O_2 . Сочетание иммобилизованной глутаматоксидазы с O_2 - или H_2O -датчиком дает глутаматный сенсор, который можно использовать для определения ALT и AST

[79]. В этом методе, однако, требуется предварительно выдерживать пробу 30 мин со смесями соответствующих субстратов. Линейная зависимость между током анодного окисления H_2O_2 и активностью ALT и AST наблюдается до 200 ед. активности/л.

Для быстрого определения ALT можно использовать также описанный в разделе 18.2.1.10 сенсор на основе системы цитохром b_2 /LDH [66].

18.3. Заключение

Амперометрические биосенсоры для определения субстратов являются надежными и высокоспецифичными приборами. Наивысший экономический эффект достигается, если их использовать в автоматических проточных приборах, например ADM 300 (ГДР), Enzymat (фирма Seres, Франция) или проточно-инжекционном анализаторе, о выпуске которого объявила фирма Control Equipment Co. (Принстон, США). В то время как для выпускаемых серийно анализаторов наибольшая производительность составляет 120 проб в час, проточно-инжекционный анализатор обеспечивает анализ 300 проб глюкозы в час [49]. Существенного увеличения чувствительности сенсора можно добиться рециклированием субстрата, что позволяет использовать сильно разбавленные пробы или уменьшить объем пробы до величины менее 1 мкл. Данный принцип открывает новые возможности для измерений в пиколярном диапазоне, т.е. в диапазоне содержаний, обычном для гормонов и антигенов. Дальнейшего прогресса в этой области можно достичь, объединяя биокатализаторы с микроэлектронными элементами, преобразующими и усиливающими сигналы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Abel P., Müller A., Fischer U. Experience with an implantable glucose sensor as a prerequisite of an artificial beta cell. *Biomed. Biochim. Acta*, **43**, 577–84 (1984).
2. A. B. 2–GDR. *Arzneimittelbuch der DDR*, Akademie-Verlag, Berlin, 1985.
3. Asperger L., Krabich Ch. Überprüfung amperometrischer Meßprinzipien zur Glucosebestimmung mit Enzymelektroden. *Acta Biotechnol.* In press (1986).
4. Bertrand C., Coulet P. R., Gautheron D. C. Enzyme electrode with collagen-immobilized cholesterol oxidase for the microdetermination of free cholesterol. *Anal. Lett.*, **12**, 1477–88 (1979).
5. Bertrand C. Multipurpose electrode with different enzyme systems bound to collagen films. *Anal. Chim. Acta*, **126**, 23–34 (1981).
6. Blaedel W. J., Engstrom R. C. Reagentless enzyme electrodes for ethanol, lactate, and malate. *Anal. Chem.*, **52**, 1691–7 (1980).
7. Cass A. E. G., Davis G., Francis G. D., Hill H. A. O., Aston W. J., Higgins I. J., Plotkin E. V., Scott L. D. L., Turner A. P. F. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.*, **56**, 667–71 (1984).
8. Cenas N., Rozgaitė J., Kulys J. Lactate, pyruvate, ethanol, and glucose-6-phosphate determination by enzyme electrode. *Biotechnol. Bioengr.*, **26**, 551–3 (1984).
9. Chua K. S., Tan I. K. Plasma glucose measurement with the Yellow Springs Glucose Analyzer. *Clin. Chem.*, **24/1**, 150–2 (1978).
10. Cordonnier M., Lawny F., Chapot D., Thomas D. Magnetic enzyme membranes as active elements of electrochemical sensors. Lactose, saccharose, maltose bienzyme electrodes. *FEBS Lett.*, **59/2**, 263–7 (1975).
11. Durliat H., Comtat M. Reagentless amperometric lactate electrode. *Anal. Chem.*, **52**, 2109–12 (1980).
12. Enfors S.-O. A glucose electrode for fermentation control. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **7**, 113–9 (1982).
13. Fogt E. J., Dodd L. M., Jenning E. M., Clemens A. H. Development and evaluation of a glucose analyzer for a glucose controlled insulin infusion system (Biostatator). *Clin. Chem.*, **24**, 1366–76 (1978).
14. Green M. J., Hill H. A. O., Tew D. G., Wolton N. J. An opsonised electrode. *FEBS Lett.*, **170**, 69–72 (1984).
15. Guilbault G. G. Analytical uses of immobilized enzymes, p. 350. Marcel Dekker, New York, 1984.
16. Guilbault G. G., Nanjo M. A phosphate-selective electrode based on immobilized alkaline phosphatase and glucose oxidase. *Anal. Chim. Acta*, **78**, 69–80 (1975).
17. Guilbault G. G., Danielsson B., Mandenius C. F., Mosbach K. Enzyme electrode and thermistor probes for determination of alcohols with alcohol oxidase. *Anal. Chem.*, **55**, 1582–5 (1983).

18. *Havas J., Porjesz E., Nagy G., Pungor M.* Glucose selective sensor. Determination of glucose content of blood and urine. *Hung. Sci. Instruments*, **49**, 53–9 (1980).
19. *Jänchen M., Walzel G., Neef B., Wolf B., Scheller F., Kühn M., Pfeiffer D., Sojka W., Jaross W.* Harnsäurebestimmung in verdünntem Serum mit enzymelektrochemischem und enzymlosem Sensor. *Biomed. Biochim. Acta*, **9**, 1055–65 (1983).
20. *Johnson J. M., Halsall H. B., Hineman W. R.* Galactose oxidase enzyme electrode with internal solution potential control. *Anal. Chem.*, **54**, 1394–9 (1982).
21. *Karube I., Hara K., Satoh I., Suzuki S.* Amperometric determination of phosphatidyl choline in serum with use of immobilized phospholipase D and choline oxidase. *Anal. Chim. Acta*, **106**, 243–50 (1979).
22. *Kelly T. A., Christian G. D.* Amperometric determination of glycerol and triglycerides using an oxygen electrode. *Analyst*, **109**, 453–6 (1984).
23. *Kihara K., Yasukawa E., Hirose S.* Sequential determination of glutamate-oxalacetate transaminase and glutamate-pyruvate transaminase activities of serum using an immobilized bienzyme-poly(vinyl chloride) membrane electrode. *Anal. Chem.*, **56**, 1876–80 (1984).
24. *Kirstein D., Schubert F., Scheller F., Abraham M., Boross L.* Amperometrische Isocitrat-bestimmung in Fermentationslösungen der mikrobiologischen Citronensäureproduktion. Abstracts of the 16th Annual Meeting of the Biochemical Society of the GDR, p. 37 (1984).
25. *Kirstein D., Kirstein L., Scheller F.* Enzyme electrode for urea with amperometric indication: part I—basic principle. *Biosensors*, **1**, 117–30 (1985).
26. *Kirstein D., Scheller F., Olsson B., Johansson G.* Enzyme electrode for urea with amperometric indication: part II—electrode with diffusional limitation. *Anal. Chim. Acta*, **171**, 345–50 (1985).
27. *Кулис Ю. Ю., Ралис Е. В., Пенькова П. С.* Прикл. биохим. микробиол. 1979. Т. 15/2. С. 282–90.
28. *Кулис Ю. Ю., Разумас В. Й.* Биокатализ в электрохимии органических соединений. Вильнюс: Мокслас, 1983. С. 61.
29. *Kulys J. J., Svirnickas G.-J. S.* Reagentless lactate sensor based on cytochrome b_2 . *Anal. Chim. Acta*, **117**, 115–20 (1980).
30. *Kulys J. J., Laurinavičius V. S. A., Pesliakienė M. V., Gurevičiūnė V. V.* The determination of glucose, hypoxanthine and uric acid with use of bi-enzyme amperometric electrodes. *Anal. Chim. Acta*, **148**, 13–18 (1983).
31. *Laval J.-M., Bourdillon Ch., Moiroux J.* Enzymatic electroanalysis: electrochemical regeneration of NAD^+ with immobilized lactate dehydrogenase modified electrodes. *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 4701–06 (1984).
32. *Levy R.* Cholesterol, lipoproteins, apoproteins, and heart disease: Present status and future prospects. *Clin. Chem.*, **27**, 653–62 (1981).
33. *Lobel E., Rishpon J.* Enzyme electrode for determination of glucose. *Anal. Chem.*, **53**, 51–3 (1981).
34. *Macholán L., Konečná H.* A biospecific membrane sensor for the determination of sucrose. *Coll. Czech. Chem. Commun.*, **48**, 798–804 (1983).
35. *Malinauskas A., Kulys J.* Alcohol and glutamate sensors based on oxidoreductases with regeneration of nicotinamide adenine dinucleotide. *Anal. Chim. Acta*, **98**, 31–7 (1978).
36. *Mascini M., Moscone D., Palleschi G.* A lactate electrode with lactate oxidase immobilized on nylon net for blood serum samples in flow systems. *Anal. Chim. Acta*, **157**, 45–51 (1984).
37. *Mascini M., Tomassetti T., Iannello M.* Determination of free and total cholesterol in human bile samples using an enzyme electrode. *Clin. Chim. Acta*, **132**, 7–15 (1983).
38. *Mascini M., Fortunati S., Moscone D., Palleschi G., Massi-Renedetti M., Fabietti P.* A L-lactate sensor with immobilized enzyme for use in in-vivo studies with an endocrine artificial pancreas. *Clin. Chem.*, **31**, 451–3 (1985).
39. *Mason M.* Determination of glucose, sucrose, lactose and ethanol in foods and beverages, using immobilized enzyme electrodes. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 981–4 (1983).
40. *Minoura N., Yamada S., Karube I., Kubo I., Suzuki S.* Determination of lactate dehydrogenase in serum by using a pyruvate sensor. *Anal. Chim. Acta*, **135**, 355–7 (1982).
41. *Mizutani F., Sasaki K., Shimura Y.* Sequential determination of L-lactate and lactate dehydrogenase with immobilized enzyme electrode. *Anal. Chem.*, **55**, 35–8 (1983).
42. *Mor J.-R., Guarnaccia R.* Assay of glucose using an electrochemical enzymatic sensor. *Anal. Biochem.*, **79**, 319–28 (1977).
43. *Müller E., Kühnel S., Trommler Ch., Günther R.* Automatisierte elektrochemische Bestimmung mit Durchfluss-messzellen. *Labortechnik*, **18**, 8–9 (1985).
44. *Nakamura K., Nankai S., Iijime T.* Bioelectrochemical sensor using immobilized enzyme electrodes. *National Tech. Rep.*, **26**, 497–506 (1980).
45. *Nanjo M., Guilbault G. G.* Enzyme electrode sensing O_2 for uric acid in serum and urine. *Anal. Chem.*, **46**, 1769–72 (1974).
46. *Newman D. P.* Membrane for enzyme electrodes. US-Patent 3979274, Int. Cl. G 01 N 27/46 (1976).
47. *Niwa H., Itoh K., Nagata A., Osawa H.* Studies on the rapid determination of glucose level in blood using the enzyme electrode, the "glucometer". *Tokaj. J. Exp. Clin. Med.*, **6/4**, 403–14 (1981).

48. Okada T., Karube I., Suzuki S. Hybrid urea sensor using nitrifying bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 149–54 (1982).
49. Olsson B., Lundbäck H., Johansson G., Scheller F., Nentwig J. Theory and application of diffusion-limited amperometric enzyme electrode detection in flow injection analysis of glucose. *Anal. Chem.*, **58**, 1046–52 (1986).
50. Osawa H., Akiyama S., Hamada T. Determination of uric acid, glucose and amylase in whole blood using enzyme electrode. *Proc. 1st Int. Sensor Symp.*, 163–8 (1981).
51. Pfeiffer D., Scheller F., Jänchen M., Bertermann K. Glucose oxidase bienzyme electrodes for ATP, NAD⁺, starch and disaccharides. *Biochimie*, **62**, 587–93 (1980).
52. Renneberg R., Schössler W., Scheller F. Amperometric enzyme sensor-based immunoassay for factor VIII related antigen. *Anal. Lett.*, **16** (B 16), 1279–89 (1983).
53. Renneberg R., Kaiser G., Scheller F., Tsujisaka Y. Enzyme sensor for pullulan and pullulanase activity. *Biotechnol. Lett.*, **11**, 809–12 (1985).
54. Renneberg R., Scheller F., Riedel K., Litschko E., Richter M. Development of anti-interference enzyme layer for α -amylase measurement of glucose containing samples. *Anal. Lett.*, **16** (B 12), 877–90 (1983).
55. Romette J. L., Froment B., Thomas D. Glucose-oxidase electrode. Measurements of glucose in samples exhibiting high variability in oxygen content. *Clin. Chim. Acta*, **95**, 249–53 (1979).
56. Romette J. L., Yang J. S., Kusakabe H., Thomas D. Enzyme electrode for specific determination of L-lysine. *Biotechnol. Bioengr.*, **25**, 2557–66 (1983).
57. Satoh I., Karube I., Suzuki S. Enzyme electrode for free cholesterol. *Biotechnol. Bioengr.*, **19**, 1095–100 (1977).
58. Scheller F., Karsten Ch. A combination of invertase reactor and glucose oxidase electrode for the successive determination of glucose and sucrose. *Anal. Chim. Acta*, **155**, 29–36 (1983).
59. Scheller F., Pfeiffer D. Enzymelektroden. *Z. Chem.*, **18**, 50–57 (1978).
60. Scheller F., Renneberg R. Glucose-eliminating enzyme electrode for direct sucrose determination in glucose-containing samples. *Anal. Chim. Acta*, **152**, 265–9 (1983).
61. Schelter-Graf A., Huck H., Schmidt H.-L. Rasche und genaue Bestimmung von Ethanol mittels einer Oxidase-Elektrode in einem Strömungs-injektions-system. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **177**, 356–8 (1983).
62. Schindler J. G., von Gülich M. L-Lactat-Durchflußelektrode mit immobilisierter Lactat-Oxidase. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **308**, 434–6 (1981).
63. Schubert F., Kirstein D., Schröder K. L., Scheller F. W. Enzyme electrodes with substrate and coenzyme amplification. *Anal. Chim. Acta*, **169**, 391–6 (1985).
64. Schubert F., Renneberg R., Scheller F. W., Kirstein L. Plant tissue hybrid electrode for determination of phosphate and fluoride. *Anal. Chem.*, **56**, 1677–82 (1984).
65. Schubert F., Kirstein D., Abraham M., Scheller F., Boross L. Horseradish peroxidase based bienzyme electrode for isocitrate. *Acta Biotechnol.*, **5**, 275–8 (1985).
66. Schubert F., Scheller F., Kirstein D., Schröder K. L., Chojnacki A. Verfahren zur elektrochemischen Bestimmung von Lactat, Pyruvat und der Aktivität von Alaninaminotransferase. DDR - Patent 222 896, *Int. Cl. C 12 Q1/26* (1984).
67. Shichiri M., Kawamori R., Hakui N., Asakawa N., Yamasaki Y., Abe H. The development of wearable-type artificial endocrine pancreas and its usefulness in glycaemic control of human diabetes mellitus. *Biomed. Biochim. Acta*, **43**, 561–8 (1984).
68. Suzuki S., Takahashi F., Satoh I., Sonobe N. Ethanol and lactic acid sensors using electrodes coated with dehydrogenase-collagen membranes. *Bull. Chem. Soc. Japan*, **48**, 3246–9 (1975).
69. Taylor P. J., Kmetec E., Johnson J. M. Design, construction, and applications of a galactose selective electrode. *Anal. Chem.*, **49**, 789–94 (1977).
70. Thévenot D. R. Problems in adapting a glucose oxidase electrochemical sensor into an implantable glucose-sensing device. *Diabetes Care*, **5/3**, 184–9 (1982).
71. Thévenot D. R., Sternberg R., Coulet P. A glucose electrode using high-stability glucose-oxidase collagen membranes. *Diabetes Care*, **5/3**, 203–6 (1982).
72. Tsuchida T., Yoda K. Immobilization of D-glucose oxidase onto a hydrogen peroxide permselective membrane and application for an enzyme electrode. *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 326–30 (1981).
73. Tsuchida T. Multi-enzyme membrane electrodes for determination of creatinine and creatine in serum. *Clin. Chem.*, **29**, 51–6 (1983).
74. Tsuchida T., Takasugi H., Yoka K., Takizawa K., Kobayashi S. Application of L-(+)-lactate electrode for clinical analysis and monitoring of tissue culture medium. *Biotechnol. Bioengr.*, **27**, 837–41 (1985).
75. Verduyn C., Zomerdijk T. P. L., van Dijken J. P., Scheffers W. A. Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 181–5 (1984).
76. Winartasaputra H., Kuan S. S., Guilbault G. G. Amperometric enzymic determination of triglycerides in serum. *Anal. Chem.*, **54**, 1987–90 (1982).

77. *Wollenberger U., Kühn M., Scheller F., Deppmeyer V., Jänchen M.* Amperometric enzyme sequence electrodes for cholesterol. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **11**, 307–17 (1983).
78. *Yamauchi H., Kusakabe H., Midorikawa Y., Fujishima T., Kuninaka A.* Enzyme electrode for determination of L-glutamate. *Abstr. 3rd Eur. Congr. Biotechnol.*, pp. I-705-10, Verlag Chemie, Weinheim, 1984.
79. *Yao T., Musha S.* Electrochemical enzymatic determination of ethanol and L-lactic acid with carbon paste electrode modified chemically with NADH. *Anal. Chim. Acta*, **110**, 203–9 (1979).
80. *Yoda K., Tsuchida T.* Bi-enzyme electrode for determination of α -amylase activity in serum. *Proc. 2nd Int. Sensor Symp., Fukuoka, 1983*, pp. 648–53.
81. *Yoshino F., Osawa H.* Rapid measurements of glucose and uric acid in whole blood using the enzyme electrodes. *Clin. Chem.*, **26**, 1060 (1980).

Глава 19

Компенсированные ферментные электроды для контроля процессов *in situ*

Свен-Олоф Эифорс

19.1. Введение

Действие многих описанных в литературе ферментных электродов основано на ферментах, которые утилизируют кислород. Эти электроды должны снабжаться достаточным количеством кислорода, чтобы он не лимитировал протекание реакции, если только не используются другие переносчики электронов. Ферментные электроды разрабатывают главным образом для работы в динамическом режиме, в котором в качестве меры концентрации определяемого вещества используют начальную скорость изменения сигнала после помещения электрода в пробу. В этом режиме работы электрода ограничения, связанные с кислородом, можно устранить, насыщая пробу кислородом до ее введения в измерительную ячейку. В работе [6] предложена ферментная мембрана с высокой растворимостью кислорода в ней. Такую мембрану можно насыщать кислородом до экспозиции электрода в пробе, а затем вводить в измерительную систему пробы, не содержащей кислород.

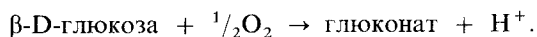
Однако использование ферментных электродов, работающих в динамическом режиме, для контроля технологических процессов вызывает затруднения. Важным преимуществом динамического режима является легкость переградуировки в ходе измерений, но для использования его в технологическом контроле требуется автоматический отбор проб.

Проблему автоматического пробоотбора при контроле ферментационных процессов с помощью ферментных электродов можно снять, конструируя электроды специально для работы в биореакторе *in situ*. Однако в этом режиме работы возникают новые проблемы, также требующие разрешения. К ним относятся: 1) обеспечение стерильности проб; 2) несовместимость непрерывности измерений со стационарным характером сигнала, соответствующего концентрации определяемого вещества; 3) необходимость исключить предварительную обработку пробы, например разбавление либо добавление кислорода или других субстратов используемой ферментативной реакции; 4) перегруппировка в процессе работы.

В данной главе описано два принципиальных подхода к решению проблемы непрерывного действия глюкозных электродов *in situ* в биореакторе: кислородная стабилизация и внешнее буферирование глюкозных электродов. В системах обоих типов микроокружение ферментов контролируется оператором так, чтобы компенсировать неблагоприятные для фермента условия.

19.2. Кислород-стабилизированный глюкозный электрод

Суммарная ферментативная реакция, протекающая в глюкозном электроде на основе глюкозооксидазы с каталазой, описывается уравнением



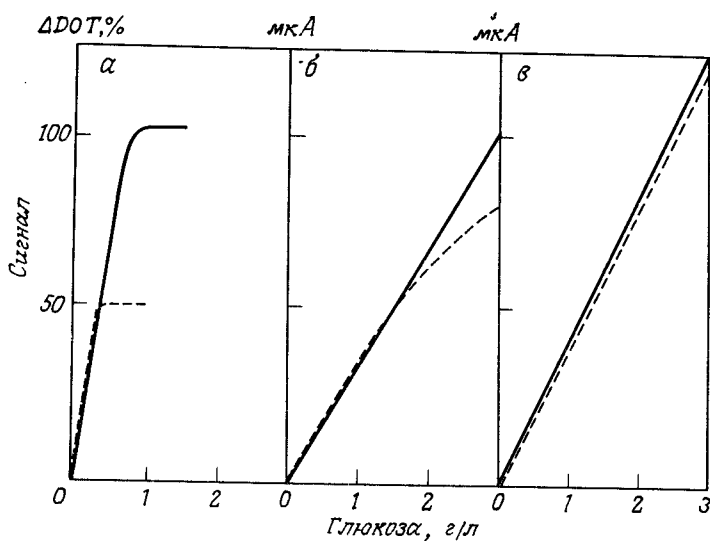
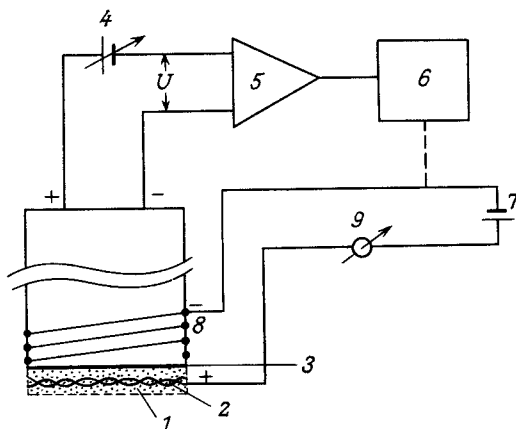


Рис. 19.1. Стационарный отклик глюкозных электродов на возрастающие концентрации глюкозы в фосфатном буфере. а: электрод, зависимый от диффузии кислорода; б: кислород-стабилизированный электрод с внутренним парциальным давлением, соответствующим 50% величины, достигаемой при насыщении электрода воздухом, в: кислород-стабилизированный электрод с внутренним парциальным давлением, соответствующим 100% при насыщении электрода воздухом. Сплошная линия: парциальное давление кислорода в пробе соответствует 100% при насыщении воздухом; штриховая линия: парциальное давление кислорода в пробе соответствует 50% величины, достигаемой при насыщении воздухом.

Растворимость кислорода в воде составляет примерно 0,25 мМ, а величина K_M относительно кислорода для глюкозооксидазы необычайно велика – около 0,5 мМ [5]. Для того чтобы отклик электрода на увеличение концентрации глюкозы был линейен, реакция на электроде должна контролироваться скоростью диффузии глюкозы в ферментный слой. Однако из-за высокого (по отношению к низкой растворимости кислорода) значения K_M отклик электрода становится нелинейным при концентрации глюкозы выше ~ 1 г/л (рис. 19.1, а). Концентрация кислорода в ферментере обычно намного ниже и может даже приближаться к нулю, вследствие чего ферментативная реакция из лимитируемой глюкозой становится лимитируемой кислородом в неопределенной точке. Таким образом, глюкозный электрод, зависящий от диффузии кислорода, непригоден для работы в ферментере *in situ*.

Для решения этой проблемы в работе [3] был предложен принцип кислородной компенсации ферментативной реакции (рис. 19.2). Глюкозооксидазу (ЕС 1.1.3.4) из *Aspergillus niger* и каталазу (ЕС 1.11.1.6) из печени быка иммобилизуют совместно на платиновой сетке, сшивая их глутаровым альдегидом в сывороточном альбумине. Далее сетку помещают вблизи чувствительной к кислороду мембраны кислородного электрода. Если при сборке электрода фермент был загрязнен микроорганизмами, его необходимо дезинфицировать, погружая, например, в 2,5%-ный раствор глутарового альдегида. Наконец, стерильный узел помещают в автоклавированный корпус электрода с ацетилцеллюлозной мембраной на торце. Для уменьшения отклика электрода сетку с ферментным слоем следует плотно прижать к ацетилцеллюлозной мембране. Платиновый электрод биосенсора включается в электрохимическую цепь как анод (рис. 19.2). При диффузии глюкозы в ферментный слой кислород потребляется в ферментативной реакции со скоростью, пропорциональной скорости поступления

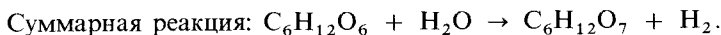
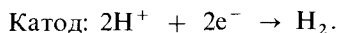
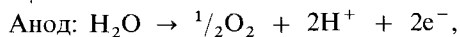
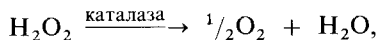
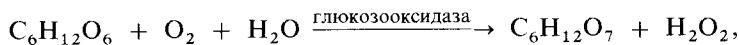
Рис. 19.2. Схема кислород-стабилизированного глюкозного электрода. 1—иммобилизованные ферменты; 2—платиновая сетка; 3—тефлоновая мембрана кислородного электрода; 4— опорное напряжение; 5—дифференциальный усилитель; 6—контроллер, поддерживающий электролитический ток на уровне, соответствующем нулевой разности напряжений (U); 7—источник напряжения в электролитической цепи; 8—платиновая спираль вокруг электрода; 9— микроамперметр.



глюкозы, которая в стационарном состоянии пропорциональна концентрации глюкозы в анализируемом растворе.

Сигнал кислородного электрода сравнивают с постоянным опорным сигналом. Протекание ферментативной реакции приводит к расходу кислорода и, соответственно, изменению измеряемой разности потенциалов. Электронная цепь генерирует ток, проходящий через анод, на котором иммобилизован фермент; при электролизе воды на поверхности платины образуется кислород. Последний диффундирует в ферментный слой, тем самым снабжая ферментативную реакцию кислородом. Ток электролиза контролируется разностью двух указанных потенциалов так, чтобы скорость образования кислорода возрастала, пока разность не упадет до нуля. Таким образом, парциальное давление кислорода в ферментном слое поддерживается на постоянном уровне, не зависящем от концентрации глюкозы, хотя чем выше скорость реакции, тем больше ток электролиза. Катодом в данной электролитической цепи служит платиновая проволока, намотанная на корпус электрода.

Ферментативные и электрохимические реакции, протекающие в кислород-стабилизированном электроде, суммированы ниже:



На каждую окисленную молекулу глюкозы через электрохимическую цепь проходит два электрона. Таким образом, при отсутствии обмена кислородом между ферментным электродом и образцом ток электролиза должен быть мерой концентрации глюкозы. Линейная зависимость тока электролиза от концентрации глюкозы показана на рис. 19.1, б и в.

Один из способов минимизации обмена кислорода заключается в использовании внешнего кислородного сенсора, чтобы получить опорный сигнал для контроля электролиза. В принципе это возможно, однако при контроле ферментационных

процессов концентрация кислорода во внешней среде может быть очень низкой, что существенно уменьшает диапазон величины отклика, поскольку парциальное давление кислорода в ферментном слое мало (ср. рис. 19.1, б и в). При более высоком опорном напряжении давление кислорода в электроде можно повысить до значений, более высоких, чем при насыщении электрода воздухом. Таким образом можно расширить область линейности отклика ферментного электрода.

Если парциальное давление кислорода в электроде выше, чем в пробе, возникает систематическая погрешность, обуславливаемая диффузионной утечкой электролитического кислорода в анализируемый раствор. Для компенсации этого эффекта в работе [4] был разработан специальный метод обработки данных. Исправленная концентрация глюкозы определяется выражением

$$S = (I - k_D)(p_{\text{внутр}} - p_{\text{внеш}})/k_G,$$

где S — концентрация глюкозы, г/л; I — ток электролиза, мкА; k_D — коэффициент массопереноса, мкА/% парциального давления при насыщении воздухом); $p_{\text{внутр}} - p_{\text{внеш}}$ — внутреннее и внешнее парциальное давление растворенного кислорода соответственно (в % от величины, соответствующей насыщению воздухом); k_G — чувствительность электрода при $p_{\text{внутр}} = p_{\text{внеш}}$, мкА/л · г⁻¹.

На рис. 19.3 показана зависимость сигнал — время для этого электрода. Видно, что постоянная времени (t_{95}) ферментативной реакции составляет около двух минут. Однако поскольку система контроля внутреннего парциального давления кислорода еще не оптимизирована, постоянная времени установления стационарного сигнала электрода достигает 5–10 мин.

Рассматриваемый электрод использован для контроля концентрации глюкозы в процессах, протекающих в *E. coli* K12 при катаболическом подавлении, при котором значительное количество глюкозы превращается в ингибиторные продукты анаэробного энергетического метаболизма, хотя концентрация глюкозы поддерживается ниже 1 г/л. В первых экспериментах по контролю концентрации глюкозы был обнаружен ярко выраженный дрейф чувствительности электрода [1]. Несколько неожиданное увеличение чувствительности электрода в первые часы протекания процесса привело к тому, что концентрация глюкозы в ферментере стабилизировалась на уровне 0,5 г/л при установке контроллера на 1 г/л. Такое увеличение чувствительности электрода никогда не наблюдалось, пока измерения проводили в буферных растворах.

Причина повышения чувствительности электрода в течение первых часов его

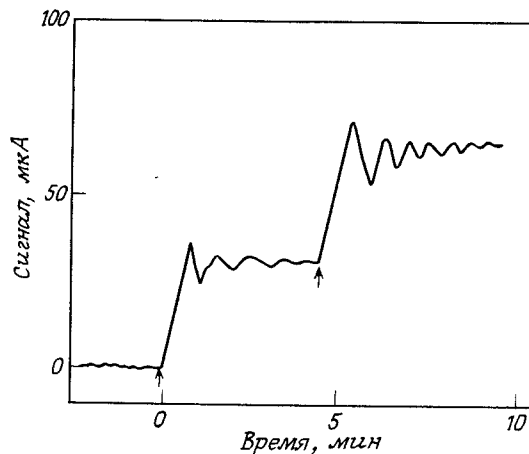
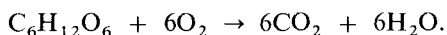


Рис. 19.3. Изменение сигнала во времени для кислород-стабилизированного глюкозного электрода в фосфатном буферном растворе при pH 7,0. Стрелками показаны моменты добавления глюкозы (увеличение концентрации на ~1 г/л).

работы в биореакторе вполне объяснима. При сборке электрода фермент был инфицирован бактериями (главным образом стафилококками), имеющимися на руках. Пока электрод использовали в буферном растворе, эти бактерии не росли и их было слишком мало, чтобы влиять на функционирование электрода. Когда электрод переместили в ферментер со средой, способствующей росту, число бактериальных клеток настолько увеличилось, что они уже могли конкурировать с глюкозооксидазой за потребление глюкозы, которая диффундировала в электрод. Это не влияло бы на функционирование электрода, если бы обе реакции имели идентичную стехиометрию. Однако в случае реакции, катализируемой глюкозооксидазой, на одну молекулу глюкозы расходуется 1/2 молекулы кислорода, тогда как окисление кислорода в процессе дыхания бактерий описывается уравнением



При использовании глюкозы для роста расходуется половина этого количества кислорода. Таким образом, электрод на основе чисто дыхательного процесса обладает в 12 раз более высокой чувствительностью, чем глюкозооксидазный электрод. В результате инфицированный электрод имеет промежуточную чувствительность в зависимости от соотношения протекающих на нем реакций.

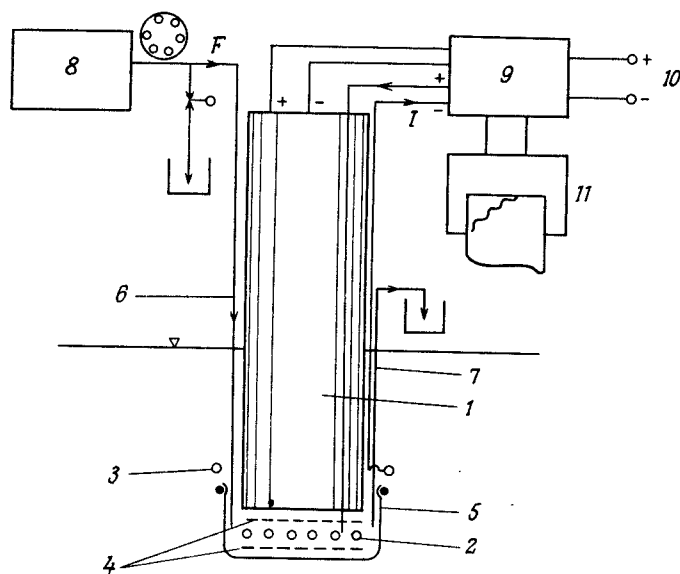
19.3. Принцип действия ферментного электрода с внешним буферированием

Основным ограничением ферментных электродов, используемых *in situ*, является то, что перед анализом пробу нельзя обрабатывать, например разбавлять, изменять pH или добавлять косубстраты ферментативной реакции. Для решения этих проблем, а также предотвращения возможного накопления ингибирующих продуктов в работе [2] был предложен принцип внешнего буферирования ферментного электрода. Этот принцип был использован для определения глюкозы. Вскоре было найдено, что кислород для ферментативной реакции можно было бы подавать из потока буферного раствора, однако отклик такого электрода является нелинейным. При использовании для определения глюкозы описанной выше системы кислородной стабилизации этот электрод работал лучше.

Конструкция глюкозного электрода с внешним буферированием и электролитическим генерированием кислорода схематически показана на рис. 19.4. Фермент и электролитическая система идентичны описанным выше. Однако в данном случае ферментный диск находится в ячейке, образованной двумя нейлоновыми сетками (15 меш), которые плотно прижаты ацетилцеллюлозной мембраной к поверхности кислородного электрода. Эта ячейка снабжена каналами ввода и вывода буферного раствора, сделанными из шприцевой иглы из нержавеющей стали внутренним диаметром 1 мм и соединенными тефлоновой трубкой с отсасывающим или подающим насосом. Температуру буферного раствора поддерживают выше комнатной, чтобы избежать забивания системы воздушными пузырьками.

Глюкоза диффундирует через ацетилцеллюлозную мембрану и смешивается с турбулентным буферным потоком в ферментной ячейке. Таким образом, при той же концентрации глюкозы в пробе реальная концентрация глюкозы, при которой работает рассматриваемый электрод, значительно ниже, чем в предыдущем случае. Это приводит к расширению диапазона линейности отклика электрода. Величина этого диапазона зависит от скорости буферного потока: при низких скоростях (0,042 мл/мин) она составляет 0–10 г/л, а при высоких (0,45 мл/мин) – 0–100 г/л. Важной особенностью буферизируемого глюкозного электрода является то, что он может работать при экстремальных значениях pH, поскольку буферный поток защищает фермент. Его

Рис. 19.4. Основные элементы ферментного электрода с внешним буферированием ([2], с разрешения American Chemical Society). 1—кислородный электрод; 2—Pt сетка с иммобилизованным ферментом; 3—Pt спираль (катод); 4—пайлоновые сетки; 5—диализная мембрана; 6—входной поток буферного раствора; 7—выходной поток буферного раствора; 8—емкость с буферным раствором; 9—контроллер; 10—опорное напряжение; 11—самописец; I—электролитический ток; F—поток буферного раствора.



можно, к примеру, использовать при pH 2,0. При скорости потока 0,15 мл/мин внутренняя концентрация глюкозы составляла около 8% от внешней концентрации. Из этого количества глюкозы около 3,75% превращалось в глюконовую кислоту.

19.4. Компенсационные ферментные электроды для технологического контроля

Описанные выше два принципа компенсации решают некоторые проблемы контроля ферментационных процессов. Кислород-стабилизированный электрод без внешнего буферирования достаточно чувствителен для контроля подачи глюкозы в процессах с угнетенным катаболизмом. Система кислородной стабилизации делает анализ не только возможным, но и не зависящим от концентрации кислорода в реакторе.

Глюкозный электрод с внешним буферированием дает возможность непрерывно следить за потреблением глюкозы в процессах, в которых ее начальная концентрация высока: если не проявляется ингибирующий эффект сахара, начальная концентрация глюкозы может составлять 100 мг/л. В таком электроде разбавление буферным раствором доводит концентрацию глюкозы до значений, которые можно измерить. Кроме того, защита фермента буферным раствором позволяет проводить анализ во вредных для фермента средах.

Основным препятствием к внедрению ферментных электродов в контроль технологических процессов является их низкая стабильность. Уменьшение сигнала может быть следствием быстрой инактивации фермента. Кроме того, поскольку реакция является не кинетически, а диффузионно контролируемой, могут возникать проблемы, связанные с загрязнением мембраны. Загрязнение может происходить независимо от того, диффундирует ли определяемое вещество непосредственно к электроду *in situ*, или в диализатор, или фильтруется и транспортируется дальше к внешнему датчику. В любом случае, если предполагается, что электрод будет работать долгое время, необходима градуировка процесса переноса вещества через мембрану.

Применение биосенсоров для непрерывного контроля различных процессов осложняется проблемой такой градуировки. Правда, в случае сенсора, работающего *in situ*,

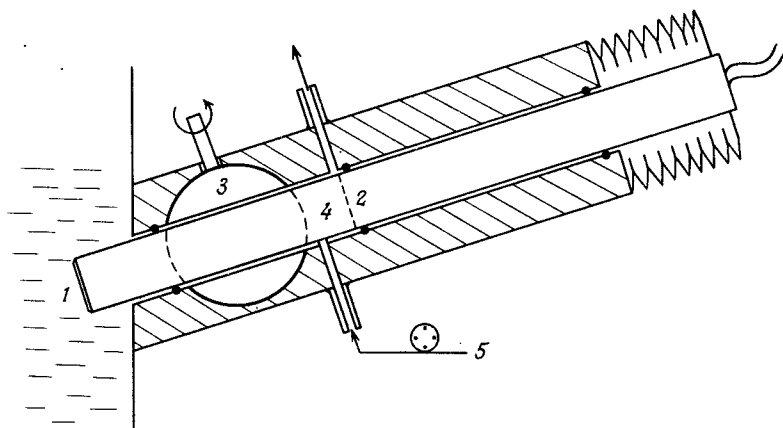


Рис. 19.5. Гнездо для градуировки сенсора *in situ*. Электрод 1 вводят в реактор через открытый шаровой кран 3. Перед градуировкой сенсор выдвигают в положение 2, после чего кран закрывают и через камеру 4 пропускается градуировочный раствор 5. После градуировки кран открывают и электрод возвращают на место в рабочее положение.

градуировка выполняется довольно просто. Рис. 19.5 иллюстрирует способ градуировки, применяемый в лаборатории автора. Суть этого способа заключается в том, что датчик вводится в систему через шаровой кран, из которого его в процессе градуировки периодически частично вытягивают.

Чтобы биосенсоры можно было широко использовать в жестких условиях в ферментере, их предстоит во многом усовершенствовать. Однако возможность компенсации окружающих факторов и градуировки помещенного в реактор сенсора делает весьма заманчивым применение биосенсоров для контроля биотехнологических процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Cleland N., Enfors S.-O. Control of glucose-fed batch cultivations of *E. coli* by means of an oxygen stabilized enzyme electrode. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 141–7 (1983).
2. Cleland N., Enfors S.-O. Externally buffered enzyme electrode for determination of glucose. *Anal. Chem.*, **56**, 1880–4 (1984).
3. Enfors S.-O. Oxygen-stabilized enzyme electrode for glucose analysis in fermentation broths. *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 29–32 (1981).
4. Enfors S.-O., Cleland N. Calibration of oxygen- and pH-based enzyme electrodes for fermentation control. In *Chemical sensors* (ed. T. Seiyama), pp. 672–676. Elsevier, Amsterdam, 1983.
5. Linek V., Benes P., Sinkula J., Holecek O., Maly V. Oxidation of D-glucose in the presence of glucose oxidase and catalase. *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 2515–27 (1980).
6. Romette J. L., Froment B., Thomas D. Glucose oxidase electrode. Measurements of glucose in samples exhibiting high variability in oxygen content. *Clin. Chim. Acta*, **95**, 249–53 (1979).

Глава 20

Применение *in vivo* химических сенсоров и биосенсоров в клинической медицине

Дензил Дж. Клермонт, Джон С. Пикап

20.1. Введение

Для целей данной главы биосенсор *in vivo* можно определить как небольшой датчик зондового типа, который вводится либо прикрепляется к телу для непрерывного определения (без добавления реагентов) концентрации веществ, представляющих интерес для выявления патологии или терапии.

В литературе многие сенсоры описывают как потенциально имплантируемые, однако, хотя они нередко представляют собой значительные научные достижения, их авторы уделяют мало внимания клиническому подтверждению возможности непрерывного мониторинга концентрации того или иного вещества. Любой *in vivo* биосенсор (до тех пор, пока они не станут в целом безвредны) представляет риск для пациента или добровольца. Поэтому, выбирая вещество для непрерывного мониторинга, важно установить критерии отбора. По нашему мнению, прежде всего это должно быть вещество, концентрация которого меняется так быстро (как, например, в случае глюкозы в крови или артериального давления кислорода, p_aO_2), что обычный анализ *in vitro* не позволяет адекватно следить за ходом этого изменения метода в минуту. Во-вторых, изменения концентрации должны иметь физиологическое или клиническое значение. Общая цель развития *in vivo* биосенсоров в медицине заключается в том, чтобы улучшить контроль состояния пациентов, и, если исходить из приведенных выше соображений, в настоящее время основными компонентами, для которых имеет смысл непрерывный мониторинг, являются содержащиеся в крови газы, рН, глюкоза и калий.

В будущем, возможно, будут разработаны системы с замкнутым контуром, в которых с помощью биосенсоров будут непрерывно контролироваться уровни содержания различных лекарственных веществ в крови, а скорости их поступления из подающего насоса будут регулироваться с помощью обратной связи, что позволит поддерживать их концентрации в узком терапевтическом диапазоне. Значительный интерес представляют и незамкнутые системы для контролируемого введения нескольких лекарственных препаратов [38, 45].

В определенных обстоятельствах имплантируемые биосенсоры могут быть также полезны для *периодического* аналитического контроля. Теоретически миниатюрные сенсоры должны обеспечивать: доступ в строго ограниченные области в организме; возможность проведения измерений в малых объемах физиологических жидкостей (например, интерстициальной жидкости) без их расходования или удаления; быстрое получение результатов. Можно предположить, что эти достоинства сенсоров можно было бы успешно использовать, например, в ходе хирургической операции, для обнаружения определенных веществ непосредственно в ткани или в сосуде с отсасываемой из нее кровью. Это позволило бы локализовать опухоль, гарантировать правильность удаления и даже установить ее биохимическую природу.

В этой главе мы попытались охватить основные клинические приложения раз-

личных *in vivo* биосенсоров. Методологические проблемы применения большинства из этих устройств рассмотрены в других главах этой книги или в оригинальных работах.

20.2. Газы крови

У здорового человека парциальные давления кислорода и диоксида углерода в артериальной крови поддерживаются в строго контролируемых пределах ($p_aO_2 = 12,6-13,3$ кПа; $p_aCO_2 = 4,5-6,1$ кПа). Однако при различных нарушениях и болезненных состояниях, прежде всего воздействующих на сердечно-сосудистую и дыхательную систему или регуляцию метаболизма (см. ниже), измерения p_aO_2 и p_aCO_2 , если не принять соответствующих мер по их корректированию, могут приводить к серьезным, а иногда и фатальным клиническим последствиям.

Нарушения, сопровождаемые отклонениями от нормы газового состава крови:

- Дыхательная недостаточность у детей
- Дыхательная недостаточность у взрослых
- Хроническая закупорка легких
- Сердечная недостаточность
- Врожденные пороки сердца
- Операции на сердце

Имеется три категории пациентов, для которых целесообразно ввести *непрерывный* мониторинг газового состава крови: недоношенные новорожденные, пациенты с острой сердечно-сосудистой или дыхательной недостаточностью (особенно требующие искусственной вентиляции легких) и, наконец, пациенты, подвергающиеся операции на открытом сердце.

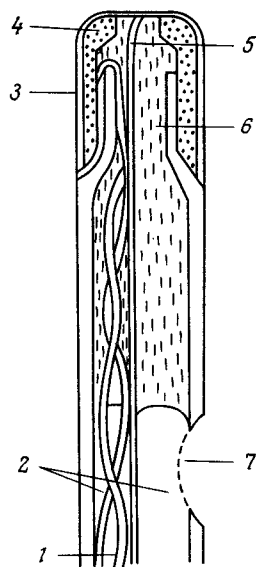
20.2.1. Мониторинг газов крови у недоношенных новорожденных детей

Именно необходимость непрерывного слежения за сердечно-сосудистой и дыхательной функцией недоношенных новорожденных и была основной причиной разработки *in vivo* кислородных сенсоров. У многих недоношенных детей легкие недоразвиты и не производят сурфактанта, поэтому их необходимо вентилировать механически. Здесь следует иметь в виду, что, с одной стороны, гипоксия может приводить к необратимому повреждению мозга, а, с другой стороны, введение кислорода в высокой концентрации может вызывать ретролентальную фиброплазию и приводить к слепоте. Таким образом, очень важно выдерживать баланс, который не угрожает жизни и не может привести к недопустимым осложнениям. В работе [37] предложен полярографический кислородный электрод типа электрода Кларка, предназначенный для введения в пупочную артерию новорожденных. Электрод состоит из серебряных анода и катода, разделенных сухим электролитом — хлоридом калия (рис. 20.1). При поддержании на электроде потенциала 750 мВ генерируемый ток пропорционален парциальному давлению кислорода в крови. Сенсор этого типа испытывали в клинических условиях [14, 44].

Возможности внутрисосудистого мониторинга имеют свои границы. Проблемы могут быть связаны с повреждением зонда вследствие тромботического осаждения на чувствительный элемент. Кроме того, как и любой прибор, постоянно находящийся внутри сосуда, зонд может быть причиной эмболии и местом проникновения инфекции. Поэтому более широко исследовались альтернативные относительно неагрессивные методы детектирования.

Еще в 1851 г. Герлах показал, что кислород диффундирует через кожу. Но первые измерения чрескожного парциального давления кислорода $p_{tc}O_2$ были проведены только через 100 лет [4]. Для полярографического определения pO_2 в слое жидкости на

Рис. 20.1. Катетерный O_2 -электрод. 1 - провод к монитору; 2 - двух-камерный катетер из ПВХ; 3 - мембрана + электролит; 4 - серебряный анод; 5 - серебряный катод; 6 - эпоксидная смола; 7 - отверстие для ввода пробы.



коже авторы [4] использовали ртутный капаящий электрод. Позднее, в 1957 г., в аналогичных экспериментах [47] применяли O_2 -электрод, разработанный Кларком годом раньше. Было найдено, что если кожу нагревать так, чтобы вызвать гиперемию, то после установления равновесия получается то же значение pO_2 , что и для артериального давления кислорода. В работе [21] гиперемию волосистой части кожи головы новорожденных вызывали, действуя на локальные участки производным никотиновой кислоты. Катетерный платиновый O_2 -электрод прикрепляли к коже, при этом показания электрода определенным образом соотносились со значениями артериального давления кислорода. Опыт, приобретенный в работе с электродом этого типа, стимулировал создание более практичных плоских сенсоров, имеющих форму пуговки (рис. 20.2). Электрод, предложенный авторами [17], состоял из большого золотого катода, который непосредственно нагревался так, чтобы вызвать локальную гиперемию. Это пионерское исследование привело к разработке ряда выпускаемых серийно систем (например, фирмами Draeger Medical Ltd., Orange Medical Instruments, Roche).

Как относительно неинвазивный метод, описанное непрерывное измерение pO_2 через кожу вызвало значительный интерес в натальной медицине. В последние годы

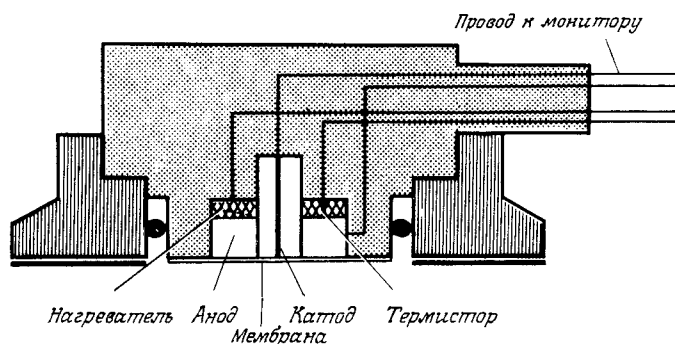


Рис. 20.2. Схема O_2 -электрода для чрескожных измерений.

данному вопросу были посвящены два международных совещания. В опубликованных трудах этих встреч содержится множество сообщений о конструкции и надежности электродов, измеряющих $p_{tc}O_2$, а также информация о различных физиологических и клинических исследованиях. Эта система несомненно внесла вклад в улучшение лечения тяжелобольных новорожденных детей, что привело к снижению как смертности, так и заболеваемости. Так, например, Oxymonitor (SM 361) фирмы Nellinge использовали для измерения чрескожного парциального давления кислорода у 810 младенцев, имевших низкий вес при рождении и требовавших искусственной вентиляции легких или введения кислорода [61]. Хотя это исследование проводилось в отсутствие контроля, авторы пришли к выводу, что, поскольку верхний предел $p_{tc}O_2$ поддерживали между 50 и 80 мм рт. ст. (6,6–10,6 кПа), респиратория возникла всего у примерно 20 младенцев, причем никто из них не ослеп. Как полагают авторы, это самое низкое из приводимых в литературе на сегодняшний день количество осложнений при таком лечении.

Успешное клиническое применение мониторинга $p_{tc}O_2$ стимулировало разработку аналогичных систем для мониторинга CO_2 ($p_{tc}CO_2$). Однако, несмотря на большое число публикаций по данному вопросу (см. [20]), пригодность мониторинга $p_{tc}CO_2$ в клинических условиях пока не установлена.

20.2.2. Мониторинг газов в крови пациентов с дыхательной недостаточностью

В настоящее время исследователи все еще спорят по поводу того, какой именно показатель (артериальное давление кислорода p_aO_2 , смешанное венозное давление кислорода p_vO_2 , смешанное венозное давление кислорода при насыщении s_vO_2) лучше отражает оксигенацию тканей пациентов, страдающих от гипоксемии либо в связи с заболеваниями дыхательных органов, либо как следствие сердечного приступа [16]. (Поскольку эта проблема относится к физиологии, мы больше не будем ее обсуждать в этой главе и опишем лишь методы определения перечисленных параметров.) При заболеваниях дыхательных органов p_aO_2 можно контролировать непосредственно, используя введенные внутрь сосудов O_2 -электроды, как описано в разделе, посвященном мониторингу новорожденных. Авторы [3] вводили с потоком внутрисосудистые O_2 -электроды в легочную артерию 25 пациентов с острой дыхательной недостаточностью, которым была необходима периодическая вентиляция при избыточном давлении. Они нашли, что если p_vO_2 падает ниже 5,3 кПа, то это свидетельствует о дыхательных или сердечных нарушениях, не всегда очевидных при клинических наблюдениях. В работе [35] электроды этого же типа помещали в правое предсердие 26 пациентов с инфарктом миокарда. При дыхании воздухом у 11 из этих пациентов в правом предсердии парциальное давление кислорода, rap_vO_2 , было ниже 4,53 кПа. В этой группе было восемь смертельных исходов. Пятнадцать пациентов имели значения $rap_vO_2 > 4,53$ кПа, и в этой группе никто не умер. Для мониторинга s_vO_2 авторы [25] использовали волоконно-оптический оксиметр. Они показали, что s_vO_2 является вполне достоверным показателем перфузии и оксигенации тканей.

Катетометр, используемый в этой системе, имел диаметр 7,5 и содержал два пластиковых волоконно-оптических световода. В оптическом модуле имелось три светодиода, обеспечивающих свет с тремя длинами волн в диапазоне 600–100 мкм. Свет с каждой длиной волны направляли последовательными импульсами с частотой 244 Гц в одно и то же оптическое волокно для освещения крови, проходящей через кончик катетера. Свет, отражаемый кровью, проходил через второе оптическое волокно и попадал на фотодетектор. Здесь световые сигналы превращались в электрические. Каждую секунду на экран выводили средние значения s_vO_2 за последние 5 с. Авторы [27] утверждают, что для пациентов с сердечно-легочной недостаточностью

s_vO_2 является лучшим показателем сердечно-легочной функции, чем p_vO_2 . Это связано с тем, что s_vO_2 определяется только параметрами системы транспорта кислорода (минутным сердечным выбросом, гемоглобином, насыщенностью артериальной крови кислородом и его потреблением), тогда как для изменения p_vO_2 достаточно сдвига процесса диссоциации комплексов кислорода с гемоглобином, без нарушений транспорта кислорода.

В работе [23] значения p_{iO_2} , измеренные с подогреванием электродов, сравнивали с величинами pO_2 , полученными *in vitro* в пробах артериальной крови трех групп пациентов. Первая группа состояла из 20 пациентов с хроническими заболеваниями дыхательных органов; коэффициент корреляции между данными двух методов $r = 0,93$. Вторая группа включала восемь пациентов с гипотермией, исследовавшихся сразу после хирургической операции, с подключением аппарата искусственного кровообращения; здесь никакой корреляции между данными двух методов не наблюдалось даже после дополнительного нагревания кожи, что, по-видимому, было обусловлено плохой циркуляцией на периферии. Наконец, в последнюю группу входило 14 пациентов отделения интенсивной терапии, получавших для дыхания воздух с различной концентрацией кислорода; в этом случае $r = 0,90$.

Авторы [19] исследовали еще один неинвазивный метод, показав, что полярографический кислородный электрод, находящийся в контакте с конъюнктивой век, измеряет значения парциального давления кислорода, связанные с давлением в нижележащем сосудистом слое. Кроме того, математический анализ на основе уравнений, описывающих диффузию кислорода в потребляющей кислород ткани, показал, что измеряемое значение pO_2 должно быть всего на 5–10 мм рт. ст. ниже, чем в сосудистом слое. В работе [24] трансконъюнктивный кислородный датчик использовали для непрерывного измерения pO_2 конъюнктивы век 19 пациентов, подвергавшихся хирургическим операциям под общим наркозом или находившихся в отделении интенсивной терапии. Артериальное давление O_2 определяли также в пробах, отбираемых из радиальной артерии. Сенсором служил миниатюрный электрод типа электрода Кларка (фирмы Orange Medical Instruments), закрепленный на овальном пластиковом корпусе (рис. 20.3), подогнанном по форме к верхнему и нижнему своду глазницы. Температуру конъюнктивы измеряли интегральным твердотельным термистором. На рис. 20.4

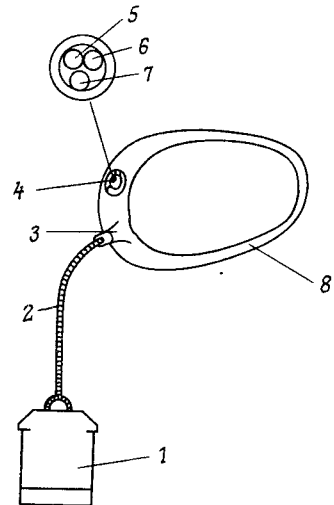


Рис. 20.3. Схема O_2 -сенсора для измерений в конъюнктиве (фирмы Orange Medical Instruments). 1 — соединитель; 2 — провод; 3 — переключка; 4 — кислородный электрод; 5 — платиновый катод; 6 — термистор; 7 — хлоридсеребряный электрод-анод; 8 — полиметилметакрилатовый корпус.

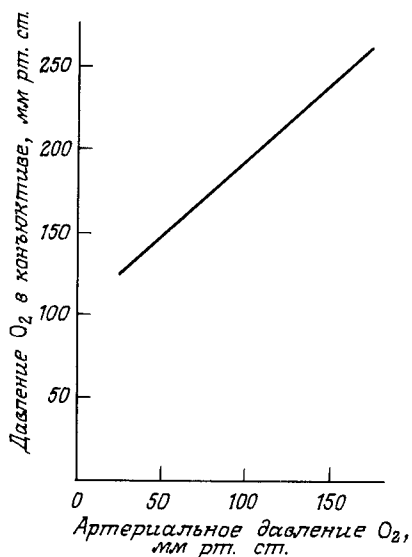


Рис. 20.4. Соотношение между средним парциальным давлением кислорода в конъюнктиве и радиальной артерии у обследованных пациентов (по данным [24]).

показано полученное соотношение между средними значениями трансконъюнктивного и артериального pO_2 .

20.2.3. Мониторинг газов крови в ходе и после операций на сердце

Операции на сердце с целью шунтирования коронарной артерии, замены дефектных сердечных клапанов и устранения врожденных пороков сердца сегодня уже стали обыденными. Для того, чтобы обеспечить сухое и неподвижное операционное поле, необходимо на время остановить поток крови через сердце и легкие, что может быть сделано с помощью искусственного кровообращения. Функции сердца и легких принимаются экстракорпоральной машиной, основными частями которой являются насос и газообменное устройство. При искусственном кровообращении газообмен строго контролируется, но без знания давления кислорода в артериальной крови трудно обеспечить оптимальный режим работы оксигенатора в экстракорпоральном контуре. До недавнего времени артериальное давление можно было определять только путем периодического, но достаточно частого отбора проб артериальной крови у пациента или из соответствующего места экстракорпорального контура с последующим измерением p_aO_2 , p_aCO_2 и pH при помощи анализатора газов крови. Искусственное кровообращение является динамической процедурой [8, 57] с быстрыми изменениями как pO_2 , так и температуры, и неизбежное запаздывание между отбором крови и получением результатов приводит к неточностям при измерениях *in vitro*. Соответственно и корректирование работы газообменного устройства на основе уже устаревших данных может быть физиологически неприемлемым. Кроме того, в условиях гипотермии необходимо корректировать результаты определения газов в крови при $37^\circ C$ на температуру крови пациента с помощью одной из нескольких номограмм [28, 48, 54], которые сами могут содержать неточности [2].

Существует ряд приборов, предназначенных специально для мониторинга кислорода в крови, проходящей через аппарат искусственного кровообращения (АИК). Хотя, строго говоря, эти приборы работают *in vitro*, так как подключаются к АИК, а не непосредственно к пациенту, они тем не менее представляют интерес и при обсуждении

in vivo сенсоров. Один из таких приборов — Oxytrode (фирмы Critikon Ltd., Тампа, Флорида, США) состоит из предварительно градуированного стерильного сменного электрода Кларка, находящегося в прямом контакте с кровью. Если сенсор введен в аппарат искусственного кровообращения, провести его градуировку можно, только подгоняя показания к значениям, полученным для той же пробы с газоанализатором.

Пытаясь преодолеть эти проблемы, авторы [36] разработали систему, в которой электрод отдален от крови стерильной газонепроницаемой мембраной и контактной жидкостью. Этот прибор, In-Line Oxygen Monitoring Systems, ILOMS (фирма Orange Instruments, Хай Виком, Бакс, Англия), схематически показан на рис. 20.5. Основные его части — это стерильное сменное Т-образное соединение с газопроницаемым окошком. В Т-образное соединение вводят многократно используемый электрод Кларка с твердотельным термистором, удерживаемым на месте байонетным разъемом. Сенсор помещают в возвратную артериальную линию АИК. Электрод градуируют на воздухе, но если необходимо, его можно повторно градуировать и при работе с АИК, сохраняя стерильность крови. Кроме того, поскольку для градуировки не требуются показания каких-либо других приборов (за исключением барометра для определения атмосферного давления), она является абсолютной и, теоретически, не содержит погрешностей. Рассматриваемый прибор испытывали *in vitro* [9]. Заметного расхождения между показаниями ILOMS и рассчитанными значениями pO_2 крови в контуре не было. Однако показания ILOMS существенно отличались от значений, полученных при анализе проб на обычном анализаторе газов крови. Прибор испытывали в клинике на 46 пациентах [8]. При помещении сенсора в возвратную артериальную линию АИК наблюдались быстрые и довольно большие изменения pO_2 . Однако, если сенсор помещали в венозную часть аппарата, показания монитора были почти

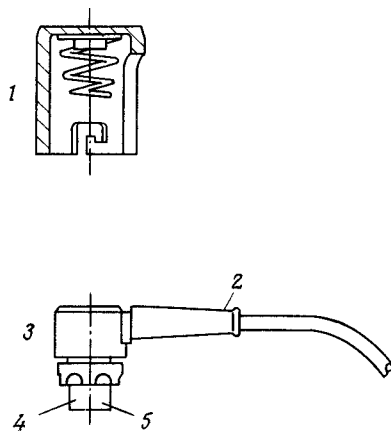
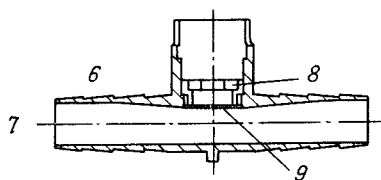


Рис. 20.5. Схема узла сенсор-соединитель системы линейного мониторинга кислорода ILOMS [9]. 1 — байонетная крышка; 2 — соединительный провод к монитору; 3 — сенсор для мониторинга «на линии»; 4 — держатель мембраны; 5 — O_2 -электрод; 6 — стерильный Т-образный соединитель; 7 — поток крови; 8 — контактная жидкость; 9 — газовое окно.



постоянными, несмотря на изменения скорости потока и температуры крови. Эти результаты свидетельствуют о том, что венозное давление O_2 нечувствительно к перфузии тканей.

Для непрерывного мониторинга смешанного венозного давления кислорода при насыщении (s_vO_2) во время и после операций на сердце использовали [25] также волоконно-оптический катетер-оксиметр (Oximeter ShawTM, Catheter Oximeter Systems, Oximetrix Inc., Маунтайн Вью, Калифорния, США). В качестве показателя нормального сердечного выброса принимали $s_vO_2 > 65\%$. При уменьшении сердечного выброса еще до изменения кровяного давления или частоты сердечных сокращений наблюдалось 10%-ное падение s_vO_2 .

20.3. Мониторинг калия

Калий имеет первостепенное физиологическое и патологическое значение. Это основной катион, присутствующий внутри клеток. Он играет важную роль в поддержании мембранного потенциала электрически возбудимых клеток, например клеток сердечной мышцы или нервных тканей. В норме концентрация K^+ в плазме поддерживается в узком диапазоне (3,8–5,5 ммоль/л), но этот тонкий баланс может нарушаться при многих заболеваниях, в том числе болезнях почек, надпочечников и желудочно-кишечного тракта, сахарном диабете, а также лекарственной терапии (например, при использовании диуретиков). Изменение содержания K^+ может существенно влиять на сердечный ритм: гиперкалиемия (наиболее серьезное нарушение, связанное с калием) вызывает брадикардию, фибрилляцию желудочков и, в тяжелых случаях, остановку сердца. Действительно, непрерывный мониторинг K^+ , очевидно, имеет наибольшую ценность для пациентов, страдающих сердечными заболеваниями (по-видимому, изменения концентрации K^+ из-за болезни почек или диабета происходят не так быстро, чтобы обычного анализа *in vitro* было недостаточно).

Рядом исследователей разработаны катетерные калийселективные сенсоры либо на основе обычного потенциометрического ионоселективного электрода с использованием валиномицина в качестве ионофора [55, 58], либо твердотельных приборов типа ионоселективных полевых транзисторов (ИСПТ), покрытых ионоселективной мембраной [34].

Одно из наиболее интересных и полезных приложений K^+ -сенсоров описано в работе [58]. Два пациента подвергались чрескожной пластической операции транспазушных сосудов сердца с использованием катетерного баллона Грюнзига для расширения коронарной артерии (эта новая методика была разработана, чтобы избежать серьезного хирургического вмешательства при необходимости расширить суженные кровеносные сосуды). Калиевый электрод вводили этим пациентам в коронарный синус (в который поступает кровь, циркулирующая через сердечную мышцу). Было проведено три последовательных раздувания баллонного катетера в течение 20 с с интервалами в 80 с. В ходе ангиопластической окклюзии пациенты не испытывали боли в груди; на электрокардиограммах, регистрируемых на поверхности тела, заметных изменений также не было. При раздувании баллона не наблюдалось изменений концентрации K^+ в коронарном синусе, но через 4,5 с после спуска баллона уровень K^+ временно повышался на 0,3 ммоль/л выше базовой линии (4,0 ммоль/л). Этот эффект интерпретировали как отмывку от K^+ из миокардиальных клеток, происходящую через несколько секунд после ишемии. Если уровень содержания K^+ в коронарном синусе действительно может служить для раннего выявления миокардиальной ишемии, то постоянно находящиеся в синусе K^+ -электроды могут быть полезны при лечении пациентов после острого инфаркта миокарда или хирургической операции на коронарной артерии.

20.4. Концентрация ионов водорода

Непрерывная регистрация рН *in vivo* пока еще не стала отработанной или рутинной процедурой, однако ряд исследований указывает на полезность для клинических исследований измерения рН *in vivo*, особенно в мышцах, тканях и желудке.

Для конструирования катетерных рН-электродов можно использовать множество ионоселективных мембран, в частности, таких, которые содержат H^+ -ионофор мезоксалонитрит *n*-октадецилокси-*m*-хлорфенилгидразина [13, 15, 30]. Такие электроды менее хрупки, чем обычные стеклянные сенсоры рН.

В работе [46] проводили непрерывный подкожный мониторинг рН в тканях 22 взрослых пациентов, причем в 14 случаях в ходе и после открытой операции на сердце. Авторы использовали миниатюрный стеклянный датчик рН и обнаружили важную корреляцию полученных результатов с результатами измерений рН в периодически отбираемых пробах артериальной крови. Однако, как и ожидалось, для пациентов с пониженной перфузией тканей корреляция была плохой.

Для определения гастроэзофагеального рефлюкса в работе [26] проводили 24-часовой мониторинг рН нижней части пищевода с помощью постоянно находящегося там рН-электрода. Проблемы, связанные с непрерывной интубацией и ограниченной способностью электрических контактов служить в таких условиях, можно решить, используя недавно разработанные и испытанные портативные радиотелеметрические системы [6, 18].

20.5. Глюкоза

Относительное или полное отсутствие инсулина у больных диабетом приводит к тому, что концентрация глюкозы в крови превышает допустимые в норме узкие пределы (около 3,5–5 моль/л натощак). Около 20% диабетиков, которые в основном заболевают в возрасте около 30 лет, страдают от полного или почти полного разрушения вырабатывающих инсулин клеток поджелудочной железы (островки Лангерганса). Диабет этого типа называют инсулин-зависимым, или диабетом I типа. Для жизни больных диабетом этого типа необходимо восполнение инсулина. Обычно инсулин вводят подкожной инъекцией. И хотя такие инъекции сохраняют жизнь и в значительной степени предотвращают симптомы острой гипергликемии, они все же не могут поддерживать уровень глюкозы в крови на недиабетическом (контрольном) уровне. Иногда содержание глюкозы падает до слишком низких величин (гипогликемия), что сопровождается неприятными проявлениями и опасной потерей сознания; часто, однако, оно столь высоко, что, как всерьез полагают, оказывает весьма существенные и длительные воздействия на ткани в глазах, нервах, почках и кровеносных сосудах.

Поэтому в течение последних нескольких лет принимались интенсивные меры к улучшению диабетического контроля. Один из важных подходов в этой области заключается в контролируемом вливании инсулина из портативного насоса «с замкнутым контуром» [41, 42], что фактически является имитацией секреции инсулина у здоровых людей. Эти приборы могут поддерживать гликемию почти в норме по меньшей мере в течение нескольких лет, однако при самых различных обстоятельствах, например после интенсивной тренировки, в ходе случайной болезни или менструации, есть опасность потери контроля. Логическое развитие этих систем – «замыкание контура» и установление обратной связи, управляющей скоростью вливания инсулина, при помощи имплантируемого глюкозного сенсора. В конечном итоге такая искусственная поджелудочная железа может стать целиком имплантируемой, но это направление находится пока на самой ранней стадии развития, поэтому, прежде чем

прогресс станет реальностью, необходимо решить бесчисленное множество технологических, биологических и этических проблем.

Между тем имплантируемые глюкозные сенсоры, не связанные с насосами, все еще имеют значительные преимущества, если необходимо дать тревожный сигнал о гипогликемии, предупредить надвигающуюся гипергликемию или кетоацидоз и вообще получать непрерывную информацию о содержании глюкозы в крови, что даст возможность пациенту самому скорректировать и отрегулировать инсулиновую терапию.

Здесь целесообразно обсудить приводимые ниже характеристики идеального глюкозного *in vivo* электрода:

1. Место мониторинга: неинвазивный чрескожный или подкожный.
2. Размер сенсора: меньше иглы размера 25.
3. Биологическая совместимость: минимальная реакция тканей.
4. Линейность отклика: 0–20 мМ.
5. Разрешение: < 1 мМ (для гипогликемического мониторинга).
6. Специфичность: не должны реагировать на метаболиты.
7. Дрейф: < 10% в день.
8. Время отклика *in vitro*: 95%-ный уровень сигнала достигается менее чем за 2–3 мин.
9. Градуировка: фабричная или простая градуировка по одной точке на месте.
10. Хранение: в устойчивой и удобной форме.
11. Конструкция: пригодная для массового производства.
12. Стоимость: низкая.

20.5.0.1. Место мониторинга. Хотя концентрация глюкозы в крови является параметром, представляющим основной клинический интерес, риск серьезного заражения и образования тромбов на чувствительном элементе исключает кровяной поток как место долговременного мониторинга. Предпочтение следовало бы отдать такому неинвазивному методу, как чрескожный мониторинг. В настоящее время имеется мало информации о проницаемости кожи для глюкозы. В 1979 г. Кларк [10] показал на кошке, находящейся под наркозом, что если сделать подкожную инъекцию глюкозы и поместить на место инъекции O_2 -электрод, то при внутривенной инъекции глюкозы показания электрода будут соответственно меняться. Автор полагает, кроме того, что фермент можно удерживать силикатной мембраной, имплантируемой на длительное время.

В качестве места мониторинга глюкозы предлагали также внутриглазную жидкость. Используя метод оптического вращения, авторы [33] обнаружили хорошую корреляцию между концентрацией глюкозы в пробах внутриглазной жидкости и крови кролика. Этот метод, однако, вряд ли найдет широкое применение для *in vivo* мониторинга глюкозы у человека, так как он требует объемного и часто неудобного оборудования, а на его результаты могут влиять различные вещества, имеющиеся в крови.

С практической точки зрения подкожная ткань была бы наиболее удобным местом для мониторинга. Именно сюда в течение нескольких лет непрерывно вводят инсулин без серьезного инфицирования или неблагоприятной местной тканевой реакции [43]. Подкожные инъекции, кроме того, хорошо переносятся большинством диабетиков. Однако в настоящее время имеется мало независимой информации о концентрации глюкозы в подкожной ткани и ее связи с уровнем глюкозы в крови. Авторы [59] имплантировали модифицированные гайтоновы капсулы, диализные мешочки и мембранные устройства Millipore в подкожное межклеточное пространство, перикард, плевру и брюшину бабуинов и/или кроликов на срок до шести месяцев. Концентрация глюкозы в жидкости, заполняющей эти приборы, находилась в диапазоне от 50 до

115 мг/дл (2,8–6,4 ммоль/л). Этот метод, однако, не дал какой-либо информации о динамике обмена глюкозы между кровью и тканью. Сведения по этому вопросу приведены ниже.

20.5.0.2. Размер. Этот параметр важен по крайней мере в трех аспектах. Во-первых, очевидно, что сенсор большого размера мало приемлем для пациентов. Во-вторых, при введении большие сенсоры неминуемо приводят к большему повреждению ткани, чем небольшие, и, помимо кровотечения, они могут изменять соотношение содержания глюкозы в ткани и крови из-за локальных изменений скорости потока крови и мышечной проницаемости. И, в-третьих, тонкие сенсоры игольчатого типа, видимо, вызывают меньшую реакцию ткани, чем большие плоские устройства [60].

20.5.0.3. Биологическая совместимость. Совместимость имплантируемых устройств определяется множеством факторов, но наиболее важным из них является природа материала. Хотя о биосовместимости полимеров и пластиков написаны целые тома книг, большинство этих материалов не годится для биосенсоров. Здесь мы рассмотрим некоторые материалы, которые можно использовать при конструировании глюкозного сенсора. По всей вероятности, такой сенсор будет представлять собой металлическую иглу; и платина, и нержавеющая сталь имеют хорошую биологическую совместимость и механическую прочность.

Большинство глюкозных сенсоров покрывают полиуретановой или ацетилцеллюлозной мембраной [40, 51] (см. также гл. 23). Именно мембрана, отделяющая тело от самого сенсора, по существу и определяет биосовместимость. Функцией мембраны является удерживание компонентов электродного сенсора (ферментов, медиаторов и коферментов), контроль доступа глюкозы и потенциально мешающих веществ в сенсор, создание диффузионного барьера, который расширяет диапазон линейности отклика сенсора без разбавления пробы, и определение в общих чертах кинетического режима работы сенсора [39].

20.5.0.4. Линейность. Поскольку у больных диабетом уровень глюкозы в крови колеблется в пределах 2–30 ммоль/л, сенсор должен иметь линейный или предсказуемый отклик приблизительно в таком диапазоне.

20.5.0.5. Разрешение. Разрешение должно быть на уровне 1 мМ или меньше, если прибор должен служить для эффективной индикации гипогликемии. Но при больших концентрациях глюкозы (около 15 ммоль/л) достаточно точности $\pm 20\%$.

20.5.0.6. Специфичность. Сенсор должен быть специфичным к глюкозе. На показания прибора не должны влиять лекарственные препараты или другие метаболиты, помимо глюкозы, с которыми связаны нарушения при диабете.

20.5.0.7. Дрейф. Показания сенсора должны быть стабильны и иметь дрейф не более примерно 10% в день.

20.5.0.8. Время отклика *in vitro*. В настоящее время имеется мало информации об относительных временах изменения концентрации глюкозы в крови и тканях. Наши исследования на свиньях (см. ниже) показали, что существует довольно тесная временная связь уровней глюкозы в крови и в подкожной ткани. При этих условиях время отклика менее 2 мин (для достижения 95%-ного уровня сигнала) было бы вполне удовлетворительным.

20.5.0.9. Градуировка. В идеале сенсор должен работать настолько стабильно и надежно, чтобы было достаточно только фабричной градуировки. За отсутствием этого можно проводить на месте градуировки по одной точке.

20.5.0.10. Конструкция. Конструкция электрода должна быть такой, чтобы он воспроизводился в больших количествах, легко стерилизовался и имел низкую стоимость. Многочисленные работы, посвященные возможным направлениям развития сенсоров, недавно рассмотрены в обзорах [39, 56] и обсуждаются в различных главах этой книги. Большинство глюкозных сенсоров включает амперометрические

или потенциометрические ферментные электроды, электрокаталитические сенсоры, не содержащие ферментов, и оптоэлектронные системы типа биоаффинного датчика [32], рассмотренного в гл. 32. Здесь мы ограничимся обзором сообщений об испытаниях *in vivo* некоторых глюкозных сенсоров на человеке и/или животных.

Авторы [53] одними из первых провели испытание *in vitro* и *in vivo* электрокаталитического глюкозного сенсора, имевшего конфигурацию топливного элемента. Сенсоры в форме диска размером $2 \times 0,2$ см имплантировали в подкожную ткань обезьян *Macaca rhesus* или кроликов. В острых опытах ток сенсора изменялся в соответствии с уровнем глюкозы в крови после еды или внутривенного введения глюкозы с задержкой 0–15 мин. По-видимому, сенсор не оказывал обратного влияния на концентрацию глюкозы. Хотя сенсоры имплантировали на несколько недель, приводится мало информации о дрейфе и биологической совместимости. В работе [31] электрокаталитический глюкозный сенсор помещали в проточную камеру, введенную в артериовенозный шунт собаки. В ходе кратковременных экспериментов в диапазоне потенциалов от $-0,4$ до $-0,8$ В уменьшение анодного тока было тесно связано с концентрацией глюкозы в крови.

Авторы [5] разработали и испытали на собаках глюкозооксидазный ферментный электрод, основанный на принципе регистрации расхода кислорода. Сенсор состоял из двух кислородных электродов, покрытых полипропиленовой мембраной и помещенных в круглый (15 мм в диаметре) пластиковый корпус. Фермент иммобилизовали на одном из электродов; уменьшение тока этого электрода сравнивали с сигналом другого, контрольного, электрода. В диапазоне 0–20 ммоль/л соотношение между разностным током и концентрацией глюкозы было нелинейным, причем сигнал существенно уменьшался при понижении давления кислорода. Электроды, имплантированные в подкожную ткань собак, регистрировали уровни глюкозы, соответствовавшие приблизительно половине уровня глюкозы в крови. Сконструировали также имплантируемую систему с замкнутым контуром, состоящую из сенсора и возвратно-поступательного инсулинового насоса, но она оказалась не в состоянии поддерживать нормальную гликемию у собак, больных диабетом. По мнению авторов, это связано с занижением сенсором истинного содержания глюкозы в ткани из-за низкого pO_2 , несмотря на дифференциальный режим его работы.

Еще один дифференциальный глюкозный сенсор на основе электрода Кларка, измеряющего расход кислорода, испытывали на собаках, у которых создавали внешний шунт между сонной артерией и яремной веной [29] и помещали электроды в шунт. Из 11 опытов четыре оказались неудачными из-за тромбоза или проблем, связанных с электрической цепью, но в остальных наблюдалась хорошая корреляция между выходным сигналом сенсора и концентрацией глюкозы в крови.

В гл. 1 описан испытанный *in vivo* амперометрический сенсор на основе иммобилизованной глюкозооксидазы, детектирующий образование пероксида водорода [12]. С 1982 г. было проведено множество предварительных кратковременных исследований этой системы на подкожной ткани и крови. Однако результатов они фактически не дали. В работах [51, 52] описан аналогичный детектор пероксида водорода игольчатого типа, который был широко опробован на животных и человеке (см. гл. 23). Между концентрациями глюкозы в подкожной ткани и крови собак имела явная связь, хотя при быстром внутривенном введении глюкозы ее содержание под кожей возрастало с задержкой в 5–15 мин и было почти на 65% ниже пикового значения в крови. Чувствительность подкожного имплантированного сенсора уменьшается до 94% первоначальной за 24 ч, до 90% за 48 ч и до 57% за 72 ч. Падение давления кислорода в ткани примерно с 38 до 25 мм рт. ст. незначительно влияет на выходные токовые сигналы. Прибор также включали в переносную систему с замкнутым контуром, испытанную на трех собаках с удаленной поджелудочной железой. При

обновлении сенсора каждые четыре дня контроль системы был вполне удовлетворительным в течение семи дней.

Другой амперометрический сенсор на основе глюкозооксидазы с детектором пероксида водорода был также недавно испытан на собаках, причем его использовали либо *ex vivo* в экстракорпоральной проточной системе, либо имплантировали под кожу [1]. Было найдено, что концентрация глюкозы в ткани составляет 30–50% от концентрации в крови.

Авторы этой главы недавно [40] начали испытания *in vivo* амперометрического сенсора с использованием ферроцена как медиатора переноса электрона, что впервые описано в работе [7] (см. также гл. 15 и 16). Они сконструировали миниатюрные сенсоры на основе полосок графитовой фольги шириной 1 мм, пропитанной 1,1'-диметилферроценом. На них иммобилизовали глюкозооксидазу и покрывали полиуретановой мембраной. *In vitro* отклик сенсоров был линейен по меньшей мере до 20 ммоль/л и почти нечувствителен к изменениям давления кислорода, встречающимся *in vivo*. При имплантации сенсора в подкожную ткань не страдающих диабетом свиней концентрации глюкозы, регистрируемые сенсором, составляли в общем случае около 20% от величин, получаемых при периодическом отборе крови и обычном лабораторном анализе. Однако резкие изменения концентрации глюкозы в крови, обуславливающие

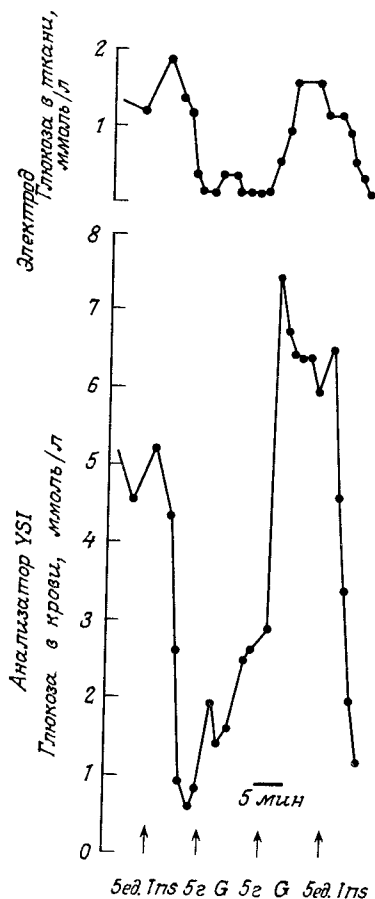


Рис. 20.6. Результаты опытов с имплантацией ферроцен-медиаторного амперометрического глюкозного электрода в подкожную жировую ткань свиньи, находящейся под наркозом. Концентрацию глюкозы в крови изменяли путем внутривенных инъекций инсулина (Ins) или глюкозы (G).

мые внутривенным введением инсулина или раствора глюкозы, отражались электродом лишь с небольшой задержкой (рис. 20.6).

Описанный в гл. 32 волоконно-оптический биоаффинный глюкозный сенсор с конканавалином А в качестве связывающего агента испытывали на собаках в кровепроточной камере [32]. Сигналы сенсора удовлетворительно соответствовали концентрациям глюкозы, оцениваемым обычным методом, но через 2 ч начинали давать пониженные значения. Авторы приписывают этот эффект падению температуры и рН крови за время опыта.

В заключение можно сказать, что испытания *in vivo* глюкозных сенсоров еще находятся в начальной стадии. Сенсоры ряда конфигураций хорошо работают в течение короткого времени, однако дрейф показаний и биологическая совместимость сенсоров в промежутки времени в несколько недель изучены недостаточно. Подкожная ткань представляется вполне подходящим местом для имплантации сенсоров. Концентрация глюкозы здесь обычно ниже, но она хорошо коррелирует с концентрацией в крови. Однако многие вопросы, например: как стерилизовать сенсор, как градуировать его *in vivo*, как будут пациенты переносить введение сенсора и, наконец, будет ли сенсор когда-либо достаточно надежным, чтобы ввести его в систему с замкнутым контуром для рутинного использования, — в значительной мере некому адресовать.

20.6. Заключительные замечания

В этой главе мы попытались дать обзор, по нашему мнению, наиболее значительных клинических приложений *in vivo* биосенсоров. Первое клиническое использование такого биосенсора было описано Кларком и сотрудниками около 25 лет назад [10]. Эти авторы применили внутримышечный платиновый катод для детектирования сердечного сброса крови «слева направо». В течение двух последних десятилетий достигнут прогресс в мониторинге газов крови: от относительно грубых (биологически несовместимых и ненадежных) внутримышечных электродов перешли к довольно сложным неинвазивным устройствам. Непрерывный контроль газов крови несомненно является значительным вкладом в оказание помощи пациентам с тяжелыми сердечно-сосудистыми нарушениями.

Мониторинг калия все еще находится в периоде становления и, вероятно, будет иметь лишь ограниченное применение в клинике.

Хотя разработка глюкозных электродов, предназначенных для анализов *in vivo*, началась почти одновременно с разработкой электродов для определения газов крови, прогресс здесь значительно более медленный. В настоящее время отсутствуют серийно выпускаемые глюкозные *in vivo* сенсоры. Однако недавние работы в этой области позволяют надеяться, что этот недостаток будет преодолен.

В качестве рабочей гипотезы можно принять, что в будущем *in vivo* сенсоры лекарственных веществ (например, цитотоксических соединений) могут быть полезны для установления индивидуальной оптимальной дозы (т.е. концентрации, которая оказывает желаемое терапевтическое действие с минимальными побочными эффектами для каждого пациента).

Биосенсоры и биотехнология сейчас широко известны и вызывают большой интерес у исследователей. Однако при разработке *in vivo* биосенсоров особое внимание следует уделять их клиническому применению для непрерывного мониторинга конкретных веществ (см. гл. 36).

ЛИТЕРАТУРА

1. Abel P., Miller A., Fischer U. Experience with an implantable glucose sensor as a prerequisite of an artificial beta cell. *Biomed. Biochim. Acta*, 5, 577–84 (1984).

2. *Andstritch R.F., Muravchik S., Gold M.I.* Temperature correction of blood gas parameters. *Anaesthesiology*, **55**, 311-16 (1981).
3. *Armstrong R.F., Secker-Walker, J., St. Andrew D., Cobbe S., Cohen S.L., Lincoln J.C.R.* Continuous monitoring of mixed venous oxygen tension in cardio-respiratory disorders. *Lancet*, **1**, 632-4 (1978).
4. *Baumberger J.P., Goodfriend R.B.* Determination of arterial oxygen tension in man by equilibration through intact skin. *Fed. Proc.*, **10**, 10-11 (1951).
5. *Bessman S.P., Thomas L.J., Kojima H., Saylor D.F., Layne E.C.* The implantation of a closed-loop artificial beta cell in dogs. *Trans. Am. Soc. Art. Int. Org.*, **27**, 7-17 (1981).
6. *Branicki F.J., Evans D.F., Ogline A.C., Atkinson M., Hardcastle J.D.* Ambulatory monitoring of oesophageal pH in reflux oesophagitis using a portable radiotelemetry system. *Gut*, **23**, 992-8 (1982).
7. *Cass A.E.G., Davis G., Francis G.D., Hill H.A.O., Aston W.J., Higgins I.J., Plotkin E.V., Scott L.D.L., Turner A.P.F.* Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.*, **56**, 667-71 (1984).
8. *Claremont D.J., Pagdin T.M.* Evaluation of a new re-usable electrode for continuous monitoring of blood PO₂ during open heart surgery. *J. Med. Eng. Tech.*, **9** (4), 174-9 (1985).
9. *Claremont D.J., Walton N.* Continuous monitoring of blood PO₂ in extracorporeal systems. *Anaesthesia*, **39**, 362-9 (1984).
10. *Clark L.C., Jr.* Continuous measurement of circulating glucose using the transcutaneous PO₂ electrode. In: Continuous transcutaneous blood gas monitoring. Birth Defects. Original Article Series (eds. A. Huch, R. Huch, and J.F. Lucey) XV, no. 4, pp. 39-42. Alan Liss Inc., New York, 1979.
11. *Clark L.C., Jr., Bargeron L.M.* Left-to-right shunt detection by an intravascular electrode with hydrogen as an indicator. *Science*, **130**, 709-710 (1959).
12. *Clark L.C., Duggan C.A.* Implanted electroenzymatic glucose sensors. *Diabetes Care*, **5**, 174-80 (1982).
13. *Cobbe S.M., Poole-Wilson P.A.* Continuous measurement of pH in central arteries and veins. *Lancet*, **2**, 444-5 (1979).
14. *Conway M., Durbin G.M., Ingram D., McIntosh N., Parker D., Reynolds E.R., Soutter L.P.* Continuous monitoring of arterial oxygen tension using a catheter-tip polarographic electrode in infants. *Paediatrics*, **57**, 244-50 (1976).
15. *Coon R.L., Lai N.C.J., Kampine J.P.* Evaluation of a dual-function pH and PCO₂ *in vivo* sensor. *J. Appl. Physiol.*, **40**, 625-9 (1976).
16. *Downs J.B.* Monitoring oxygen delivery in acute respiratory failure. *Respiratory Care*, **28** (5), 608-13 (1983).
17. *Eberhardt P., Hammacher K., Minat W.* Methode zur kutanen Messung des asuerstoff-druckes. *Biomed. Techn. (Stuttgart)*, **6**, 216-21 (1973).
18. *Falor W.H., Change B., White H.A., Kraus J.M., Taylor B., Hansel J.R., Kraus F.C.* Twenty-four hour oesophageal pH monitoring by telemetry. *Am. J. Surg.*, **142**, 514-16 (1981).
19. *Fatt I., Deutsch T.A.* The relation of conjunctival PO₂ to capillary bed PO₂. *Critical Care Med.*, **11** (6), 445-8 (1983).
20. Continuous transcutaneous blood gas monitoring. Reproductive medicine. Huch R., Huch A. (eds.). Vol. 5. Marcel Dekker Inc., New York and Basel, 1983.
21. *Huch A., Huch R., Lubbers D.W.* Quantitative polarographische sauerstoffdruckmessung auf der kopfhaut des neurogeborenen. *Arch. Gynaekol.*, **207**, 443-52 (1969).
22. Continuous transcutaneous blood gas monitoring. Birth defects. Original Article Series XV. Huch R., Lucery J.R. (eds.), no. 4, Alan R. Liss, New York, 1979.
23. *Hutchison D.C.S., Rocca G., Honeybourne D.* Estimation of arterial oxygen tension in adult subjects using a transcutaneous electrode. *Thorax*, **36**, 473-7 (1981).
24. *Isenberg S.J., Shoemaker W.C.* The transconjunctival oxygen monitor. *Am. J. Ophthalmol.*, **95**, 803-6 (1983).
25. *Jamieson W.R.E., Turnbull K.W., Larriea A.J., Dodds W.A., Allison J.C., Tyers G.F.O.* Continuous monitoring of mixed venous saturation in cardiac surgery. *The Canadian Journal of Surgery*, **25** (5), 538-43 (1982).
26. *Johnson L.F., DeMeester T.R.* Twenty-four hour pH monitoring of the distal esophagus. A quantitative measure of gastroesophageal reflux. *Am. J. Gastroenterol.*, **62**, 325-32 (1974).
27. *Kandel G., Aberman A.* Mixed venous oxygen saturation: its role in the assessment of the critically ill patient. *Arch. Intern. Med.*, **143**, 1400-2 (1983).
28. *Kelman G.R., Nunn J.F.* Nomograms for correction of blood PO₂, PCO₂ pH and base excess for time and temperature. *J. Appl. Physiol.*, **21**, 1484-90 (1966).
29. *Kondo T., Ito K., Ohkura K., Ito K., Ikeda S.* A miniature glucose sensor, implantable in the blood stream. *Diabetes Care*, **5**, 218-21 (1982).
30. *LeBlanc D.H., Brown J.F., Klebe J.F., Niedrach L.W., Shusartzuk G.M.J., Stoddard W.H.* Polymer membrane sensors for continuous intravascular monitoring of blood pH. *J. Appl. Physiol.*, **40**, 644-7 (1976).

31. Lewandowski J. J., Szczepanska-Sadowski E., Krzymien J., Nalecz M. Amperometric glucose sensor: short-term in vivo test. *Diabetes Care*, **5**, 238-44 (1982).
32. Mansouri S., Schulz J. S. A miniature optical glucose sensor based on affinity binding. *Biotechnology*, **2**, 885-90 (1984).
33. March W. F., Rabinovitch B., Adams R. L., Wise J. R., Melton M. Ocular glucose sensor. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, XXVIII, 232-5 (1982).
34. McKinley B. A., Saffle J., Jordan W. S., Janata J., Moss S. D., Westernskow D. R. In vivo continuous monitoring of K^+ in animals using ISFET probes. *Medical Instrumentation*, **14**, 93-7 (1980).
35. Moxham J., Armstrong R. F. Continuous monitoring of right atrial oxygen tension in patients with myocardial infarction. *Intensive Care Med.*, **7**, 157-64 (1981).
36. Parker D., Delpy D. T., Halsall D. N. A new approach to in-line gas monitoring. Development of an oxygen sensor. *Med. Biol. Eng. Comp.*, **21**, 134-7 (1983).
37. Parker D., Key A., Davies R. S. Catheter-tip transducer for continuous in vivo measurement of oxygen tension. *Lancet*, **1**, 952 (1971).
38. Pickup J. C. Clinical applications of infusion system. *J. Med. Eng. Technol.*, **8**, 101-7 (1984).
39. Pickup J. C. Biosensors: a clinical perspective. *Lancet*, **2**, 817-20 (1985).
40. Pickup J. C., Claremont D. J. A potentially implantable glucose sensor with direct electron transfer. *Diab. Res. Clin. Prac. Suppl.*, **1**, 447 (1985).
41. Pickup J. C., Rothwell D. Technology and the diabetic patient. *Med. Biol. Eng. Comput.*, **22**, 385-400 (1984).
42. Pickup J. C., Keen H., Parsons J. A., Alberti K. G. M. M. Continuous subcutaneous insulin infusion: an approach to achieving normoglycaemia. *Brit. Med. J.*, **1**, 204-7 (1978).
43. Pickup J. C., Viberti G. C., White M. C., Kohner E. M., Parsons J. A., Alberti K. G. M. M. Continuous subcutaneous insulin infusion in the treatment of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **3**, 290-300 (1980).
44. Pollitzer M., Soutter L. P., Reynolds E. R., Whitehead M. Continuous monitoring of arterial oxygen tension in infants: four years of experience with an intravascular oxygen electrode. *Paediatrics*, **66** (1), 31-6 (1980).
45. Rate Control in Drug Therapy. Prescott L. F., Nimmo W. S. (eds.). Churchill Livingstone, Edinburgh, 1985.
46. Rithalia S. V. S., Herbert P., Tinker J. Continuous monitoring of tissue pH. *BMJ*, **1**, 1460 (1979).
47. Rooth G., Sjostedt S., Caligora F. Bloodless determination of oxygen tension by polarography. *Science Tools*, **4**, 37-45 (1957).
48. Severinghaus J. W. Blood gas calculation. *J. Appl. Physiol.*, **21**, 1108-16 (1966).
49. Shichiri M., Kawamori R. Feasibility of needle-type glucose sensor and the wearable artificial endocrine pancreas. In *Diabetes treatment with implantable insulin infusion systems*. (eds. K. Irsigler, H. Kritz, R. Lovett), pp. 224-30. Urban and Schwarzenberg, Munich, 1983.
50. Shichiri M., Hakui N., Yamasaki Y., Abe H. Closed-loop glycaemic control with a wearable artificial endocrine pancreas. *Diabetes*, **33**, 1200-2 (1984).
51. Shichiri M., Yamasaki Y., Haukui N., Abe H. Wearable-type artificial pancreas with needle-type glucose sensor. *Lancet*, **2**, 1129-31 (1982).
52. Shichiri M., Goriya Y., Yamasaki Y., Abmura M., Kawai N., Abe H. Glycaemic control in pancreatectomised dogs with a wearable artificial pancreas. *Diabetologia*, **24**, 179-84 (1983).
53. Soeldner J. S., Change K. W., Aisenberg S., Hiebert J. M. Progress towards a implantable glucose sensor and an artificial beta cell. In *Temporal aspects of therapeutics* (eds. J. Urquhart, F. E. Yates), pp. 181-207. Plenum, New York, 1973.
54. Thomas L. J. Algorithms for selected blood acid-base blood gas calculations. *J. Appl. Physiol.*, **33**, 154-8 (1972).
55. Treasure T., Band D. M. A catheter-tip potassium selective electrode. *J. Med. Eng. Tech.*, **1**, 271 (1977).
56. Turner A. P. F., Pickup J. C. Diabetes mellitus: biosensors for research and management. *Biosensors*, **1**, 85-115 (1985).
57. Walpoth B., Dernierre D., Eglott L., Turina M. Continuous oxygen partial pressure monitoring in cardiac surgery. *Proc. Eur. Soc. Art. Org.*, **8**, 301-8 (1981).
58. Webb S. C., Rickards A. F., Poole-Wilson P. A. Coronary artery potassium concentration recorded during coronary angioplasty. *Br. Heart J.*, **50**, 146-8 (1983).
59. Wolfson S. K., Tokarsky J. F., Krupper M. A. Glucose concentration at possible sensor sites. *Diabetes Care*, **5**, 162-5 (1982).
60. Woodward S. C. How fibroblasts and giant cells encapsulate implants: considerations in design of glucose sensors. *Diabetes Care*, **5**, 278-81 (1982).
61. Yamanouchi I., Igarashi I., Ouchi E. Successful prevention of retinopathy of prematurity via transcutaneous oxygen partial pressure monitoring. In *Continuous transcutaneous blood gas monitoring*. Reproductive medicine (eds. R. Huch, A. Huch), vol. 5, pp. 333-40. Marcel Dekker, New York and Basel, 1983.

Глава 21

Тонкопленочные микроэлектроды для электрохимического анализа

*О. Прохазка**

21.1. Резюме

Для анализа сложных процессов, представляющих интерес для биомедицины, в живых тканях требуется многопараметровый мониторинг. Пригодные для этого датчики чаще всего должны быть исключительно малы, поэтому входящие в них сенсоры должны располагаться близко друг к другу. Развитые в физике тонких пленок и электронике твердого тела методы позволяют создавать миниатюрные многоцелевые сенсорные ансамбли, которые успешно применяли при исследовании мозга. Помимо специфических конструкторских проблем, обуславливаемых технологическими ограничениями, миниатюрным тонкопленочным металлическим электродам присущи все недостатки металлических проволочных электродов. В данной главе описывается новый электрод камерного типа, который, по-видимому, позволяет преодолеть многие из этих проблем и, кроме того, пригоден для конструирования миниатюрных электрохимических ячеек.

21.2. Введение

Исследования миниатюрных химических сенсоров мотивируются как экономическими, так и методологическими причинами. Совершенствование техники мониторинга может завершиться размещением сенсоров на кристалле кремния вблизи электронной схемы с приданием им чрезвычайно малых размеров, чтобы исключить повреждение или разрушение анализируемого образца. При исследовании мозга, например, чтобы разобраться в пространственной взаимосвязи нейронов, требуются многоцелевые электродные ансамбли [12, 18], а для объяснения как нормальной, так и патологической активности нейронов приходится регистрировать множество параметров [2, 6]. Обычные способы склеивания позволяют объединять в ансамбль лишь небольшое число стеклянных или металлических микроэлектродов. Методы, развитые в современной физике тонких пленок и электронике твердого тела, позволяют создавать строго определенные структуры размером порядка нескольких микрон и могут быть весьма полезны также при конструировании новых приборов для медицинских исследований, хирургии и наблюдения пациентов при интенсивной терапии.

В этой главе будут рассмотрены проблемы, возникающие при изготовлении и конструировании миниатюрных электрических и электрохимических тонкопленочных сенсоров для исследований *in vivo*, а также ограничения и некоторые новые аспекты разработки этих приборов. Описываются механически и электрически устойчивые миниатюрные Ag/AgCl электроды сравнения и конструкция новых миниатюрных сенсоров камерного типа.

В данной работе, выполненной в Институте общей электротехники и электроники Венского Университета (Австрия), принимали участие Х. Драгаун, П. Гойзер, А. Яхимович, Ф. Коль, В. Морэс, Ф. Олкайтаг, К. Пиркер, П. Пфундер, Р. Шалауэр и Г. Урбан.

21.3. Миниатюрные тонкопленочные многоэлектродные датчики

Тонкопленочные и твердотельные методы [15], развитые главным образом для улучшения качества, плотности упаковки элементов и массового производства интегральных схем, пригодны для изготовления ансамблей электродов, расположенных в строго заданном порядке [20]. Их помещают на подложках, имеющих форму тонкой иглы, которую можно вводить в ткань. Такой многоэлектродный датчик показан на рис. 21.1. Датчик разрабатывали для измерения электрической активности мозговой ткани, в частности в кортексе кроликов. Восемь электродов с площадью рабочей поверхности 2500 мкм^2 располагаются по прямой на расстоянии 300 мкм друг от друга; девятый электрод, находящийся на 1 мм ниже восьмого, предназначен для одновременной регистрации активности гиппокампа под кортикальной структурой [18].

21.3.1. Изготовление датчика

На рис. 21.2 схематически показаны поперечное сечение датчика (а) и тонкопленочный электрод (б). Технология фотолитографии обеспечивает высокую степень гибкости при размещении электродов в ансамбле и позволяет подгонять конструкцию соответствующего электродного ансамбля к анатомическому строению ткани. Эта методика включает следующие стадии.

1. Рисуют схему расположения металлических элементов и изоляторов и уменьшают ее фотографически в несколько сот раз, определяя тем самым размер и расположение электродов на так называемой маске. На рис. 21.3 для примера показаны маски металлического (а) и изоляционного слоя (б) 16-электродного датчика. Электро-

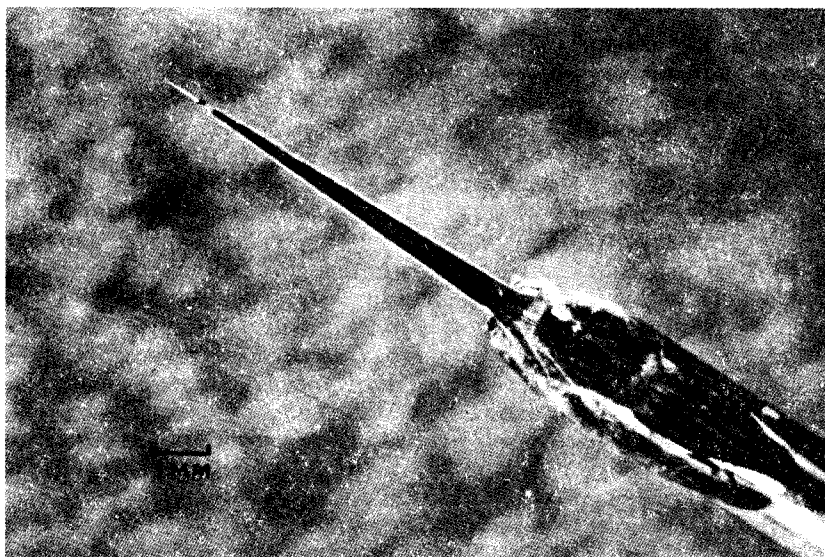


Рис. 21.1. Тонкопленочный многоэлектродный датчик для регистрации электрической активности мозга животных. Датчик состоит из девяти регистрирующих электродов с размером регистрирующих участков 2500 мкм^2 , расположенных на одной прямой на игольчатом стеклянном носителе толщиной $0,1 \text{ мм}$.

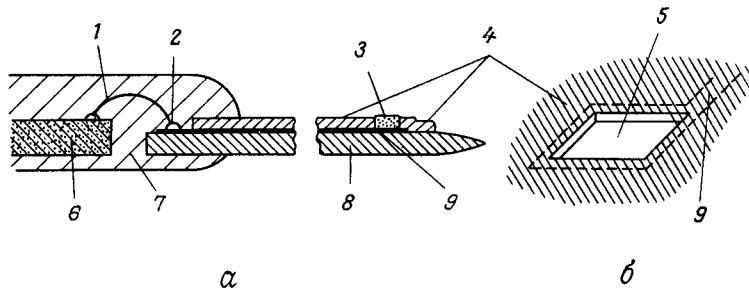


Рис. 21.2. Поперечное сечение тонкопленочного многоэлектродного датчика (а) и увеличенное изображение тонкопленочного электрода (б). 1—связующая проволока; 2—контакт; 3—электроосажденный металлический электрод; 4—тонкий изолирующий слой; 5—регистрирующий участок до электроосаждения; 6—токоподвод или интегральная схема; 7—искусственная смола; 8—стеклянная подложка; 9—тонкая металлическая связующая дорожка.

ды расположены по прямой на расстоянии 100 мкм друг от друга; площадь регистрирующего участка каждого электрода 225 мкм².

2. На поверхность тщательно очищенной стеклянной подложки толщиной 100 мкм напыляют тройной слой Cr—Au—Cr толщиной 0,1 мкм (Cr служит адгезионным слоем). Затем металлический слой полностью покрывают слоем фоторезиста, растворимость

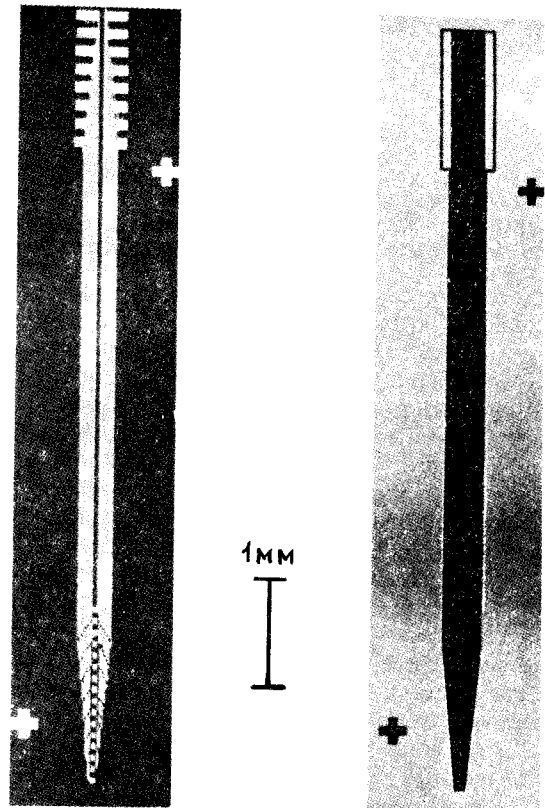


Рис. 21.3. Маски металлического (а) и изолирующего (б) слоев 16-электродного датчика; с помощью описанной в тексте техники фотолитографии можно изготовить любую требуемую двумерную электродную систему.

которого меняется после экспозиции в ультрафиолетовом свете. После первой экспозиции через металлическую маску и обработки соответствующим растворителем («проявление») фоторезист покрывает только те части тонкой металлической пленки, которые образуют электродные участки, тонкие металлические связующие дорожки и контакты. Незакрытую металлическую пленку вытравливают избирательно действующими травильными растворами для Cr и Au [25]. Затем методами химического напыления в плазме наносят изолирующий слой Si_3N_4 толщиной 2–3 мкм, покрывающий как металлическую структуру, так и стеклянную подложку. После второй фотолитографической стадии с использованием маски изолирующего слоя фоторезист покрывает изолирующий слой за исключением электродных и контактных участков. Метод плазменного травления позволяет получать строго определенные электродные участки даже микронных размеров.

Далее стеклянную подложку обрезают алмазным стеклорезом под микроскопом, придавая ей иглообразную форму. Модифицированная методика изготовления стеклянного микроэлектрода позволяет изготовить датчик с тонким кончиком, который можно плавно вводить в мозговую ткань. Описанную тонкую металлическую структуру можно связать с изолированными медными выводами или непосредственно с интегральными электронными схемами. Связующие участки должны быть защищены как электрически, так и механически; обычно их покрывают синтетической смолой или силиконовой резиной. Верхний слой Cr на электродных участках удаляют, а остающийся слой Au можно дополнительно покрыть электролитическими слоями различных металлов, например золота, платины или серебра (последнее можно превратить в AgCl, и таким образом получится электрод сравнения), с тем чтобы создать гладкую поверхность датчика, либо для различных прикладных целей, обсуждаемых ниже.

Для многоэлектродных датчиков используют и другие изоляционные материалы и металлы [5, 13, 16, 21, 27]. Широкие возможности заключаются в интегрировании электродов с лежащими под ними электронными схемами. Исследуется также возможность введения интегральной схемы непосредственно в ту же кремниевую подложку, на которой формируют электроды [22, 26].

21.3.2. Электрические характеристики датчиков

Электроды образуют систему электрод–электролит с тканью, электрические свойства которой определяют прохождение сигнала, помехи между парами тонких металлических токоподводов и сопряжение сигналов через тонкий изоляционный слой. Чтобы быть уверенным в отсутствии помех при регистрации сигнала, необходимо проанализировать электрические характеристики этой системы, их зависимость от частоты сигнала, размера и материала электрода и электролита.

Границу раздела между электродом и электролитом можно представить эквивалентной электрической цепью, учитывая как процессы переноса заряда в двойном электрическом слое вблизи поверхности электрода, так и протекающие на этой поверхности процессы диффузии, кристаллизации и химические реакции [24].

При регистрации электрической активности мозговой ткани измеряют изменения потенциалов между тонкопленочными электродами и большим электродом сравнения. Во время измерений ток необходимо минимизировать во избежание раздражения ткани. Это означает, что кристаллизационные и химические процессы на электродных поверхностях можно исключить, и эквивалентная схема, представляющая границу раздела электрод–электролит, сводится к комбинации RC . Сопротивление R и емкость C этой цепи можно определить путем вольтамперометрических измерений. Чтобы полученные результаты можно было сравнивать с импедансом больших электродов [7], далее также будут использоваться эквивалентные RC -цепочки.

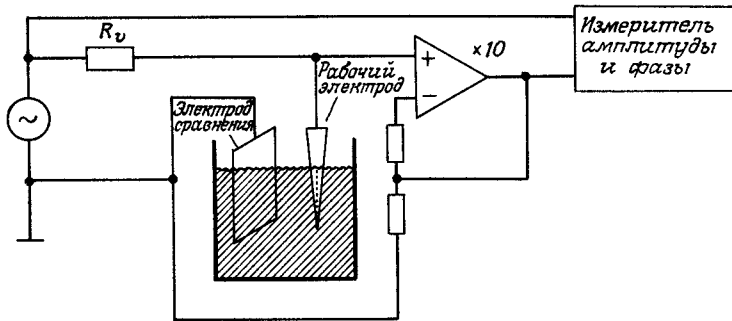


Рис. 21.4. Схема установки для измерения импеданса границы раздела электрод-электролит; амплитудные и фазовые измерения позволяют рассчитать емкостную и омическую составляющие импеданса.

На рис. 21.4 приведена схема установки для определения импеданса электрод-электролитной системы Z и его омической и емкостной составляющих. R и C рассчитывают в соответствии с правилом деления напряжения из измеряемого соотношения между приложенным напряжением и его падением на электродном импедансе, а также их сдвигом по фазе. Наши предварительные опыты, в согласии с теорией [24] и данными других авторов [7], показали, что как только плотность тока превысит критическое значение, измеряемый импеданс границы раздела электрод-электролит становится функцией плотности тока. Поэтому при исследовании границы раздела электрод-электролит мы поддерживали плотность тока ниже 1 мкА/мм^2 .

Рис. 21.5 демонстрирует сильную частотную зависимость Z , R и C тонкопленочных золотых электродов с площадью поверхности $0,25 \text{ мм}^2$; $0,01 \text{ мм}^2$ и 2500 мкм^2 . Из приведенных зависимостей видно, что, как и предсказывает теория, импеданс обратно пропорционален площади электрода. Емкостная составляющая импеданса почти не зависит от частоты; это свидетельствует о том, что для металлического электрода она определяется емкостью двойного слоя. Однако омическая составляющая импеданса

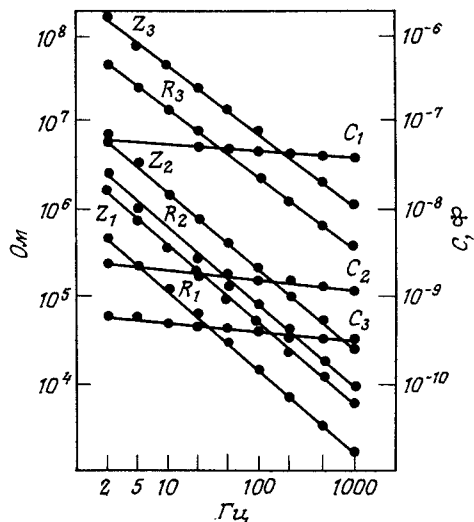


Рис. 21.5. Частотные зависимости Z , R и C тонкопленочных золотых электродов площадью $0,25 \text{ мм}^2$ (Z_1, R_1, C_1); $0,01 \text{ мм}^2$ (Z_2, R_2, C_2) и 2500 мкм^2 (Z_3, R_3, C_3).

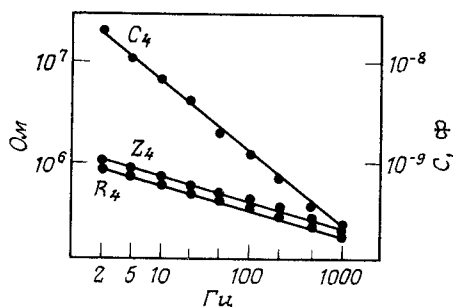


Рис. 21.6. Частотные зависимости Z , R и C механически и электрически устойчивого Ag/AgCl -электрода с площадью рабочей поверхности 2500 мкм^2 (фактическая площадь поверхности электрода намного больше).

сильно зависит от частоты и, следовательно, определяется главным образом диффузионным сопротивлением.

Высококачественные Ag/AgCl -электроды обладают совершенно иными свойствами. Изготовление этих электродов обсуждается ниже. Из рис. 21.6 видно, что Z и R хлоридсеребряного электрода с площадью поверхности 2500 мкм^2 почти не зависят от частоты, а емкостная составляющая импеданса пренебрежимо мала. Кроме того, при частотах ниже 10 Гц импеданс Au электродов в 100 и более раз превышает импеданс Ag/AgCl -электродов того же размера.

Различные импедансные характеристики и определяют преимущества электродов этих двух типов для разных приложений. Активность одного нейрона лучше изучать с помощью миниатюрных золотых электродов, тогда как изменения потенциала в частотном диапазоне ниже 100 Гц регистрируются с меньшими искажениями при использовании Ag/AgCl -электродов.

Для того чтобы Ag/AgCl -электроды обладали электрической стабильностью, необходимо прежде всего обеспечить их механическую прочность. Это особенно важно, поскольку такие электроды могут использоваться также как миниатюрные электроды сравнения. Поэтому мы вкратце рассмотрим основные стадии изготовления Ag/AgCl -электродов. Участки тонкопленочного золотого электрода сначала электролитически покрывают слоем серебра толщиной 1 мкм , который затем превращают в AgCl электролизом в 1% -ном растворе NaCl . Амплитудная и частотная зависимости импеданса Ag/AgCl -электрода сильно зависят от заряда, пропущенного через раствор в процессе хлорирования. На рис. 21.7 показаны изменения импеданса Ag/AgCl -электрода, при изготовлении которого плотность тока составляла $0,03 \text{ мА}/\text{мм}^2$ в течение 10 , 50 , 100 и 180 с . Наблюдаемые изменения импеданса согласуются с предположением о том, что рост Ag/AgCl начинается в энергетически выгодных точках на поверхности серебра [9]. Тогда сильная частотная зависимость при частотах ниже 100 Гц обуславливается оставшейся серебряной поверхностью. При непрерывном достаточно длительном электроосаждении образуется сплошной слой с минимальными значениями импеданса (Z_8). Дальнейший электролиз приводит к утолщению слоя Ag/AgCl и

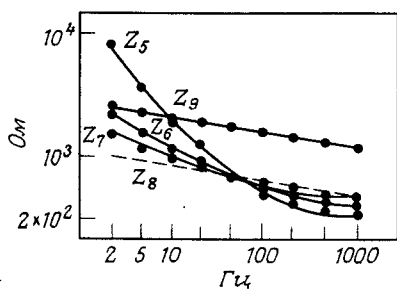


Рис. 21.7. Изменение частотных зависимостей импеданса границы раздела электрод-электролит для серебряного электрода, обработанного хлоридом в течение 10 (Z_5), 50 (Z_6), 100 (Z_7) и 180 с (Z_8) при плотности тока $0,03 \text{ мА}/\text{мм}^2$.

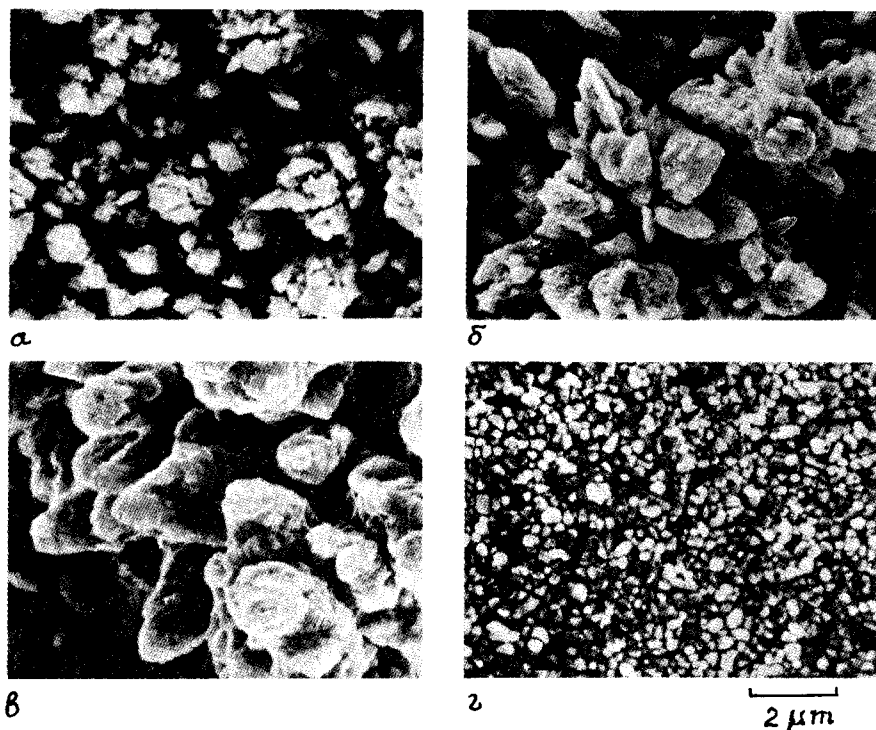


Рис. 21.8. Изменения поверхности Ag/AgCl в зависимости от времени электролиза: 2 с (а), 25 с (б), 35 с (в) – при плотности тока $0,15 \text{ mA}/\text{мм}^2$. На рисунке г показана поверхность Ag/AgCl -электрода после обработки хлоридом при плотности тока $0,03 \text{ mA}/\text{мм}^2$ в течение 200 с.

возрастанию его импеданса из-за того, что сопротивление хлорида серебра составляет только $10^5 \text{ Ом}/\text{см}^2$ [9].

Образование механически стабильных слоев Ag/AgCl зависит от используемой в этом процессе плотности тока: полученные на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) фотографии слоев Ag/AgCl , сформированных при плотности тока $0,15 \text{ mA}/\text{мм}^2$ в течение 2 с (рис. 21.8, а), 25 с (б) и 35 с (в), показывают их существенное структурное отличие от механически весьма стабильного слоя Ag/AgCl , который формировали по плотности тока $0,03 \text{ mA}/\text{мм}^2$ в течение 200 с (г). Последний режим мы успешно использовали при изготовлении всех миниатюрных Ag/AgCl -электродов.

21.3.3. Источники искажения сигнала и практические ограничения

Чтобы сигнал тонкопленочного многоэлектродного датчика не искажался, датчик должен иметь соответствующую конструкцию. Значительные искажения сигнала могут обуславливаться джонсоновским шумом [10] импеданса границы раздела электрод–электролит, паразитной емкостью между тонкопленочными металлическими соединительными дорожками через слой изолятора и утечками между напыленными токоподводами. Размеры тонких металлических соединительных дорожек и толщина изолирующего слоя определяются размером датчика и материалом, из которого он изготавливается [19]. В этой связи следует отметить, что существующее оборудование для тонкопленочной и твердотельной технологии в принципе позволяет

изготавливать даже субмикронные структуры, что может существенно расширить область применения миниатюрных микроэлектродов.

Покрывая тонкопленочные электроды стандартным электролитом и ионоселективной мембраной [1], можно получать тонкопленочные ионоселективные электроды. Такие двух- или трехэлектродные устройства могли бы служить измерительными вольтамперометрическими системами, обладающими преимуществами микроэлектродов [3].

Основные ограничения в применении тонкопленочных электродов налагаются качеством электродного и изолирующего материала, что, кстати, необходимо учитывать при разработке потенциометрических и вольтамперометрических химических сенсоров. Одной из проблем является то, что потенциал Ag/AgCl-электродов зависит от концентрации Cl^- , а это может приводить к серьезным искажениям сигнала. Еще одна проблема обусловлена тем, что в случае двухэлектродной вольтамперометрической системы электрод сравнения должен быть намного больше рабочего электрода. В трехэлектродной системе минимальный размер Ag/AgCl-электрода сравнения определяется током утечки усилителя, поскольку этот ток может быть достаточно велик, чтобы управлять осаждением Ag/AgCl и тем самым изменением потенциала электрода. Кроме того, тогда становятся невозможными вольтамперометрические измерения *in vivo*, поскольку ткань раздражается проходящим при этом током. Первым реальным шагом в преодолении указанных проблем была разработка новых миниатюрных электродов камерного типа.

21.4. Электроды камерного типа

На рис. 21.9 показаны поперечное сечение и вид сверху электрода камерного типа. В отличие от устройства на рис. 21.2, где плоский тонкий слой изолятора покрывает тонкие металлические связующие дорожки и ансамбль тонкопленочных электродов, здесь изоляционный слой сверху изогнут и образует камеру, закрывающую электрод. Контакт между электродом и анализируемым раствором осуществляется через отверстие в камере, размер которого и определяет фактический размер регистрирующего участка системы. На рис. 21.10 приведена СЭМ-фотография электрода камерного типа, сформированного в слое изолятора Si_3N_4 толщиной 3 мкм путем химического напыления в плазме [17, 25]. Диаметр отверстия равен 15 мкм. Высота, ширина и длина камеры составляют соответственно примерно 3, 45 и 80 мкм. Найденная частотная зависимость импеданса показывает, что сопротивление электролитного мостика в этой камере ниже мегаомного диапазона. Кроме того, Ag/AgCl-электроды, закрытые такими камерами, становятся нечувствительными к быстрым флуктуациям концентрации

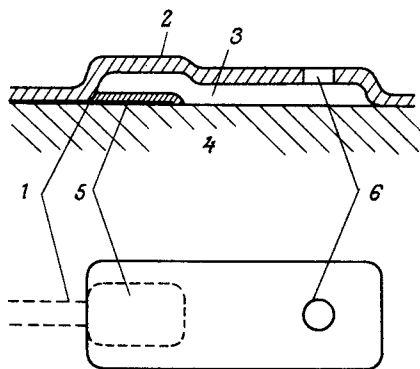
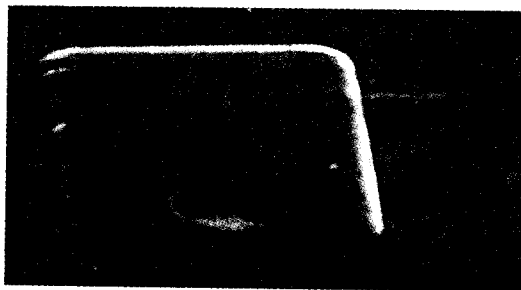


Рис. 21.9. Поперечное сечение и вид сверху электрода камерного типа. 1 — тонкий металлический токоподвод; 2 — изолирующий слой; 3 — камера; 4 — подложка; 5 — электрод; 6 — регистрирующий участок.

Рис. 21.10. Фотография электрода камерного типа, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа (увеличено в 1000 раз).



хлорид-ионов. Время отклика на изменения концентрации Cl^- может увеличиться до 8 с, если расстояние между электродом и отверстием равно 30 мкм, и до 150 с при расстоянии 80 мкм. Эти результаты позволяют надеяться, что может быть найдена такая конструкция камеры, которая существенно улучшит качество миниатюрных электродов сравнения.

Основные преимущества камерных датчиков заключаются в следующем:

- 1) можно исключить прямой контакт между тканью и электродным материалом;
- 2) рабочая площадь электрода не зависит от его размера, а определяется размером отверстия;
- 3) поскольку можно использовать электроды большой площади, искажение сигнала может быть минимальным;

4) миниатюрные электрохимические ячейки можно конструировать таким образом, чтобы получались потенциометрические или вольтамперометрические сенсоры.

Поместив в камеру ионоселективную мембрану, сенсоры этого типа можно использовать как ионоселективные электроды, а нанеся ферментный слой, можно получить ферментный электрод. Камера не только защищает селективные мембраны и слой от любого механического воздействия, но и обеспечивает приведение в контакт с пробой лишь небольшой части селективной мембраны, что увеличивает время жизни миниатюрного сенсора. В том случае, когда камера закрывает ряд электродов, вольтамперометрические изменения можно использовать прежде всего для определения состава растворов. Камерная конструкция особенно ценна для диффузионно-контролируемых процессов, поскольку электроды в ней защищены и обеспечивается их стабильное окружение.

Используя золотой электрод с площадью поверхности 25 мкм^2 , помещенный непосредственно под отверстием, и Ag/AgCl -электрод сравнения (1600 мкм^2), сконструировали кислородный сенсор для амперометрических измерений в мозге животных. Время отклика системы составляло около 0,3 с, что хорошо согласуется с расчетными значениями. Главное преимущество такого сенсора заключается в том, что электрический ток проходит только в камере и не влияет на испытуемый объект, что особенно важно в случае исследования нервных тканей.

21.5. Заключительные замечания

Методы тонкопленочной и твердотельной технологии открывают широкие и многообразные возможности при разработке миниатюрных электрохимических сенсоров. Основные достоинства миниатюрных тонкопленочных электродов уже выяснены [4], хотя, чтобы достичь высокого качества и стабильности микрохимических сенсоров, еще потребуются интенсивные исследования. Основным преимуществом миниатюрных сенсоров могла бы быть возможность многопараметрических измерений.

Близко расположенные сенсоры камерного типа, каждый из которых является замкнутой единицей, не мешают друг другу и позволяют, кроме того, одновременно регистрировать физические параметры исследуемой системы, используя высокочувствительные тонкопленочные датчики температуры [23] и давления [8, 11, 14], расположенные на той же интегральной плате.

Благодарности

Финансирование этих исследований осуществляли Austrian Fonds zur Foerderung der wissenschaftlichen Forschung (проект № S 22/09), а также Ludwig Boltzman Society (Австрия). Мы хотим поблагодарить профессоров В. Фальмана, Ф. Пашке, Х. Петше и Р. Фольмера за стимулирующие обсуждения и поддержку.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burgess B., Burleigh P., Diamond H. Thin film solid state electrochemical sensors. Proc. Biosensors, 48-50. Los Angeles, 1982.
2. Caspers H., Speckmann E.J., Lehmenkuehler A. Electrogenesis of cortical DC potentials. In Motivation, motor and sensory processes of the brain. (Eds. H. H. Kornhuber. L. Duecke). Progr. Brain Res., **54**, 3-15 (1980).
3. Caudill W.L., Howell J.O., Wightman R.M. Flow rate independent amperometric cell. Anal. Chem., **54**, 2532-5 (1982).
4. Davis G., Prohaska O., Olcaytug F. Enzyme coupled reactions at micro-voltammetric electrodes, Communication for Anal. Chem. In preparation (1986).
5. Edell D.J. A biocompatible, multi-channel neuroelectric interface. Proc. 35th ACEMB, p. 6 (1982).
6. Elger C.E., Speckmann E.J., Prohaska O., Caspers H. Pattern of intracortical potential distribution during focal interictal epileptiform discharges (FIED) and its relation to spinal field potentials in the rat. Electroenceph. Clin. Neurophysiol., **51**, 393-402 (1981).
7. Geddes L.A. Electrodes and the measurement of bioelectric events, Wiley-Interscience, New York, 1972.
8. Guckel H., Burns D.W. Planar processed polysilicon sealed cavities for pressure transducer arrays, Technical Digest IEEE IEDM, p. 223 (1984).
9. Jaenicke W., Tischer R.P., Gerischer H. Die anodische Bildung von Silberchlorid-Deckschichten und Umlagerungserscheinungen nach ihrer kathodischen Reduktion zu Silber, Z. Elektrochem. Angew. Physik. Chem., **59**, 448-55 (1955).
10. Johnson J.B. Thermal agitation of electricity in conductors. Rhys. Rev., **32**, 97-109 (1928).
11. Ko W.H., Bio M., Hong Y. A high-sensitivity integrated-circuit capacitive pressure transducer, IEEE Trans. Electron Devices, **29**, 48-56 (1982).
12. Krueger J. Simultaneous individual recordings from many cerebral neurons: techniques and results. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., **98**, 177-233 (1983).
13. Kuperstein M., Whittington D.A. A practical 24 channel microelectrode for neural recording in vivo. IEEE Trans. BME, **28**, 288-293 (1981).
14. Lee Y.S., Wise K.D. A batch-fabricated silicon capacitive pressure transducer with low temperature sensitivity. IEEE Trans. Electron Devices, **29**, 42-48 (1982).
15. Maissel L., Glang R. Handbook of thin-film technology. McGraw-Hill, New York, 1970.
16. May G.A., Shamma S.A., White R.L. A tantalum-on-sapphire microelectrode array, IEEE Trans. Electron Devices, **26**, 1932-39 (1979).
17. Olcaytug F., Riedling K., Fallmann W. A low temperature process for the reactive formation of Si₃N₄ layers on InSb. Thin Solid Films, **67**, 321-4 (1980).
18. Petsche H., Pockberger H., Rappelsberger P. On the search for the sources of the electroencephalogram. Neuroscience, **11**, 1-29 (1984).
19. Prohaska O., Olcaytug F., Pfundner P., Dragaun H.G. Thin-film multiple electrode probes: possibilities and limitations. IEEE Trans. Biomed. Eng., **33**, 223-9 (1986).
20. Prohaska O., Womastek K., Petsche H. A multielectrode for intracortical recordings produced by thin-film technology, Electroenceph. Clin. Neurophysiol., **42**, 421-2 (1981).
21. Shamma-Donoghue S.A., May G.A., Cotter N.E., White R.L. Thin-film multiple arrays for a cochlear prostheses, IEEE Trans. Electron Devices, **29**, 136-44 (1982).
22. Takahashi K., Matsuo T. Integration of multi-microelectrode and interface circuits by silicon planar and three-dimensional fabrication technology, Sensors and Actuators, **5**, 89-99 (1984).

23. *Urban G., Kohl F., Olcaytuğ F., Vollmer R., Prohaska O.* Duennschichttemperaturfuehler fuer Mehrfachmessungen im Kortex, *Wiss. Berichte, Jahrestagung Oesterr. Ges. BMT*, 273-6 (1982).
24. *Vetter K.J.* Electrochemical kinetics. Academic Press, New York, 1962.
25. *Vossen J.L., Kern W.* Thin-film processes. Acad. Press, New York, 1978.
26. *Wise K.D., Najafi K.* A micromachined integrated sensor with on-chip self-test capabilities, *Proc. IEEE Solid-State Sensor Conference*, 1984, pp. 12-16.
27. *Wise K.D., Angell J.B.* A low-capacitance multielectrode probe for neurophysiology, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **22**, 212-19 (1975).

Проектирование и разработка глюкозных сенсоров для искусственной поджелудочной железы

Гилберто Д. Велхо, Джерард Рич, Даниэль Р. Тевено

22.1. Введение

Инсулин, полипептидный гормон, производимый бета-клетками поджелудочной железы, жизненно необходим во многих метаболических путях углеводов, белков и жиров: при отсутствии нормальной секреции инсулина расстраивается энергетический гомеостазис организма. Сахарный диабет характеризуется относительным или абсолютным недостатком инсулина, проявляющимся в утрате контроля над уровнем глюкозы в циркулирующей крови и других метаболических отклонениях от нормы.

Диабет часто встречается в богатых обществах, охватывая от одного до трех процентов всего населения и нередко от пяти до десяти процентов людей в возрасте свыше 40 лет [22]. В развивающихся странах, где были проведены систематические обследования, преобладает уровень заболеваемости от одного до двух процентов населения [5]. Таким образом, диабет представляет собой одну из важнейших проблем всемирного здравоохранения, оказавшую сильное влияние на социальное и экономическое развитие общества, главным образом из-за вызываемых им осложнений. Авторы [1], ссылаясь на доклад Национальной комиссии по диабету в конгрессе США [35], полагают, что в этой стране у больных диабетом вероятность возникновения слепоты в 25 раз, болезней почек в 17 раз, гангрены в 5 раз и болезней сердца в 2 раза выше, чем у людей, не страдающих этим заболеванием. Ожидаемая продолжительность жизни у больных диабетом приблизительно на одну треть меньше, чем у населения в целом.

Сахарный диабет является гетерогенной болезнью, и только у небольшой части пациентов, представляющей, однако, три человека на тысячу человек населения, секреция инсулина нарушена настолько, что требуется инсулиновая терапия. С момента ее появления в начале двадцатых и до конца семидесятых годов инсулиновую терапию осуществляли только путем периодического введения инсулина при помощи одной, двух, а иногда и нескольких ежедневных инъекций.

Поиски лучших методов лечения инсулин-зависимого диабета и связанных с ним осложнений в последнее десятилетие привели к разработке новых устройств для инсулиновой терапии. Для врачей-клиницистов и пациентов, страдающих диабетом, были созданы системы непрерывной подачи инсулина (инсулиновые насосы), состоящие из резервуара, насоса и источника питания, объединенных в один портативный блок. В настоящее время в нескольких лабораториях с успехом разрабатывают портативную саморегулируемую систему, объединяющую имплантируемый глюкозный сенсор с устройством для подачи инсулина. Эту систему принято называть системой с замкнутым контуром в отличие от предыдущей несаморегулируемой системы, известной как система с открытым контуром (рис. 22.1). На рис. 22.2 показаны графики подачи инсулина системами с открытым и замкнутым контуром в сравнении с аналогичными графиками для физиологической регуляции секреции инсулина.

Рис. 22.1. Схемы трех возможных методов инсулинотерапии. а: интенсивная терапия (многократные инъекции инсулина в зависимости от результатов определения глюкозы с помощью полоски индикаторной бумаги); б: система с открытым контуром (непрерывное вливание инсулина, программируемое в зависимости от результатов определения глюкозы с помощью полоски индикаторной бумаги); в: система с замкнутым контуром (непрерывное саморегулируемое вливание инсулина. Компьютер задает скорость введения инсулина в зависимости от непрерывно измеряемой сенсором концентрации глюкозы).

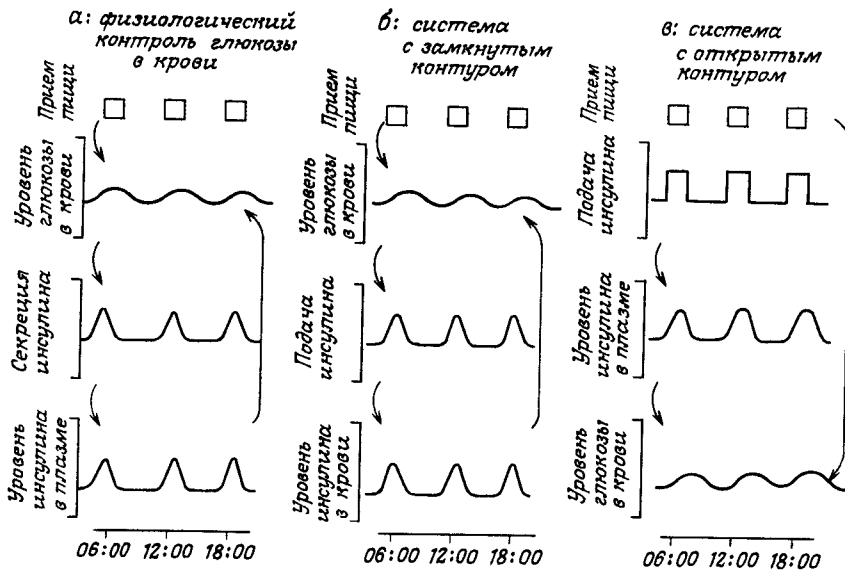
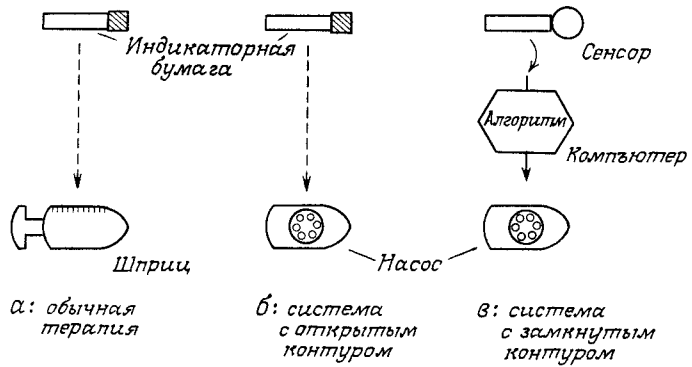


Рис. 22.2. Физиологическая регуляция глюкозы в крови поджелудочной железой (а) и контроль ввода инсулина системами с замкнутым (б) и открытым контуром (в). В последнем случае введение инсулина программируется так, чтобы нормализовать содержание глюкозы в крови, а не регулируется уровнем глюкозы.

В этой главе рассмотрены преимущества системы с замкнутым контуром для инсулиновой терапии, требования к имплантируемому глюкозному сенсору, а также современное состояние разработки и применения глюкозных сенсоров.

22.2. Нужны ли на самом деле инсулиновые системы с замкнутым контуром?

Установление связи между микрососудистыми осложнениями при сахарном диабете и гипергликемией [46] привело к интенсификации инсулиновой терапии либо многократными ежедневными инъекциями инсулина, либо непрерывным его вливанием в надежде, что это улучшит метаболический контроль и тем самым предотвратит возникновение последующих осложнений. Сравнив содержание сахара в крови больных инсулин-зависимым диабетом при использовании искусственной поджелудочной железы (система с замкнутым контуром), насоса для непрерывного вливания инсулина (открытая система) и интенсифицированной обычной инсулиновой терапии, авторы [37] не обнаружили заметной разницы между этими тремя режимами. Они полагают, что все три метода в принципе способны обеспечить примерно одинаковую, почти нормальную гликемию.

Основные достоинства и недостатки трех вышеупомянутых методов инсулиновой терапии суммированы в табл. 22.1. Наиболее распространенная интенсивная инсули-

Таблица 22.1. Основные достоинства и недостатки различных методов инсулиновой терапии

Обычная терапия	Система с открытым контуром	Система с замкнутым контуром
<i>Недостатки</i>		
Многочисленные инъекции	Высокая стоимость	Отсутствие портативного прибора
Необходимость частого определения глюкозы	Необходимость частого определения глюкозы Необходимость ношения пациентом Может выйти из строя Агрегация инсулина	Гиперинсулинемия Внутривенные инъекции Необходимость ношения пациентом Может выйти из строя Агрегация инсулина
<i>Достоинства</i>		
Может использоваться немедленно	Может использоваться немедленно	Независимость от внешних измерений уровня глюкозы
Низкая стоимость, не требуется специального оборудования	Не требуются многочисленные инъекции	Автоподстройка при изменениях физической нагрузки или диеты
Подкожные инъекции	Подкожные инъекции	

новая терапия недорога, не требует специального оборудования и непосредственно доступна для каждого пациента. Однако для достижения близкой к норме гликемии необходимы многократные ежедневные инъекции.

Приборы с открытым контуром не имеют этого ограничения. Они, однако, дороги, требуют постоянного ношения пациентом и, подобно любым другим механическим приборам, могут выходить из строя. Существует также проблема агрегации инсулина, что приводит к потере его биологической активности и закупорке внутренних каналов прибора [30]. Как и в обычной инсулиновой терапии, в терапии с использованием открытой системы от пациента требуется частое определение глюкозы, чтобы удерживать гликемию на должном уровне, поскольку дозы инсулина зависят от диеты и физической нагрузки. К достоинствам обоих терапевтических методов относятся

относительная свобода выбора времени введения дозы инсулина при приеме пищи и путей подачи инсулина. Доза инсулина при приеме пищи не контролируется поглощением пищи в кишке, как у здоровых людей, или как при использовании системы с замкнутым контуром, и, таким образом, она должна контролироваться самим пациентом. Поскольку уровни глюкозы и инсулина в крови после еды зависят от интервала между введением инсулина и приемом пищи, правильный выбор этого интервала помогает нормализовать гликемию и содержание инсулина. Авторы [15] сравнили влияние 30-минутного подкожного вливания инсулина, начатого за 60 мин, 30 мин и непосредственно перед приемом пищи, на изменения содержания глюкозы и инсулина после обеда в плазме крови у лиц с инсулин-зависимым сахарным диабетом. Они нашли, что при введении инсулина за 60 мин перед приемом пищи графики изменений содержания глюкозы и инсулина получаются наиболее близкими к норме, причем доза инсулина может быть меньше. Это 60-минутное упреждение, вероятно, необходимо по двум взаимодополняющим причинам. Во-первых, это время частично может потребоваться для подстройки физиологической инсулинизации печени инсулином, введенным подкожно. Во-вторых, секреция инсулина у здоровых людей контролируется не только увеличением концентрации глюкозы в крови: реакция клеток, вырабатывающих инсулин, стимулируется еще раньше нервной деятельностью и желудочно-кишечными гормонами. Таким образом, при правильном выборе дозы и времени инъекции или вливания инсулина можно обеспечить почти нормальный контроль глюкозы подкожным введением инсулина как при обычной интенсивной терапии, так и при использовании систем с замкнутым контуром. Это позволяет избежать осложнений, связанных с повреждением сосудов при длительном внутривенном вливании инсулина.

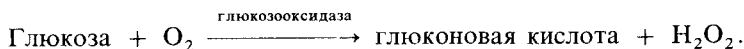
Основным достоинством системы введения инсулина с замкнутым контуром является ее независимость от внешних определений глюкозы в крови и способность покрывать изменяющуюся потребность в инсулине в зависимости от физической нагрузки и диеты. Тем не менее достигаемая с помощью этих устройств нормализация гликемии нередко сопровождается периферической гиперинсулинемией [24]. Последняя обычно наблюдается при любом периферическом введении инсулина и обусловлена главным образом отсутствием градиента инсулина в воротной вене. Кроме того, она может быть также следствием запаздывания с введением инсулина в ответ на изменение содержания глюкозы. Таким образом, гиперинсулинемии этого типа можно избежать, комбинируя контролируемое обратной связью введение инсулина с предварительно программируемым вливанием инсулина перед принятием пищи [10]. Следовательно, в конструкции систем с замкнутым контуром должна быть предусмотрена возможность «ручного» и «полуавтоматического» режима.

Существующие в настоящее время системы с замкнутым контуром имеют ряд недостатков. Это громоздкие прикроватные приборы, которые нуждаются в непрерывном отборе крови больного, чтобы обеспечить автоматический анализ на глюкозу. Небольшие портативные приборы пока еще серийно не производятся. Для введения инсулина в системах с замкнутым контуром, будь то портативные или стационарные системы, необходим длительный доступ в вену. Всасывание инсулина при его подкожном или перитонеальном введении происходит недостаточно быстро, чтобы обеспечить контроль скорости введения инсулина через обратную связь. Наконец, системы с замкнутым контуром, будучи автоматическими, должны быть исключительно надежными как с точки зрения механической прочности, так и в смысле точности показаний глюкозного сенсора, иначе будет утрачено их основное преимущество, т.е. минимальный контроль уровня глюкозы со стороны пациента. Дополнительной проблемой, которую необходимо решить, является агрегация вводимого насосом инсулина [9].

22.3. Почему до сих пор отсутствует портативное устройство для введения инсулина с замкнутым контуром?

Такое устройство по существу состоит из глюкозного сенсора, насоса и компьютера, который воспринимает информацию от сенсора и в соответствии с ней регулирует скорость введения инсулина. Насосы и компьютеры выпускаются серийно. В отличие от них имплантируемый глюкозный сенсор, который доказал бы свою надежность, еще только предстоит разработать.

В большинстве известных до сих пор глюкозных сенсорах используется окисление β -D-глюкозы растворенным кислородом в присутствии β -D-глюкозооксидазы (GOD, EC 1.1.3.4) по реакции



Такие сенсоры состоят из электрохимических детекторов (электродов), различным образом связанных с ферментной основой. Химическую реакцию можно контролировать по концентрациям трех участвующих в ней веществ, т. е. по расходу кислорода, образованию глюконовой кислоты или пероксида водорода.

Портативный или имплантируемый сенсор на основе глюкозооксидазы, который можно было бы использовать в приборе с замкнутым контуром, должен удовлетворять следующим требованиям [47]:

Высокая специфичность к глюкозе

Линейность отклика в диапазоне концентраций глюкозы 1–15 ммоль/л

Время отклика меньше 10 мин

Независимость сигнала от гидродинамики и колебаний давления кислорода в тканях

Устойчивость глюкозооксидазной мембраны в тканях при 37 °C

Биологическая совместимость

Длительный срок службы (по меньшей мере несколько дней)

Миниатюризация головки сенсора.

Ниже эти требования обсуждаются более подробно. Звездочкой отмечены общие требования, справедливые и для других типов глюкозных сенсоров.

1. Высокая специфичность к глюкозе*. В случае глюкозооксидазных сенсоров это требование включает высокую специфичность фермента и электрохимическую специфичность детекторов. Первое условие выполняется всегда, поскольку глюкозооксидаза катализирует окисление лишь очень немногих соединений, помимо глюкозы, и притом со значительно более низкой скоростью [4]. И, наоборот, второе условие нередко не выполняется и зависит главным образом от типа используемого электрохимического детектора (см. раздел 22.4).

2. Диапазон линейности отклика сенсора in vivo от 1 до 15 ммоль/л* (рис. 22.3, б). Этот довольно узкий диапазон линейности подтверждается недавними данными [23], полученными при исследовании свойств изолированных островков Лангерганса у человека (рис. 22.3, а). Предельная концентрация глюкозы, требуемая для стимуляции инсулинового выброса, лежит между 2 и 4 ммоль/л, секреторный инсулиновый отклик на глюкозную стимуляцию равен половине максимального значения при концентрации глюкозы приблизительно 5 ммоль/л и выходит на плато при 10 ммоль/л. В условиях in vivo градуировочный график глюкозооксидазного сенсора не всегда линеен во всем этом диапазоне (см., например, рис. 22.4, кривая 1). Фактически уровень глюкозы в ткани и крови, особенно у больных диабетом, может быть выше значения кажущейся константы Михаэлиса (K_M) глюкозооксидазы в растворе глюкозы, насыщенном воздухом (от 4 до 10 ммоль/л по неопубликованным данным Apothecker A., Thevenot D. R., Wilson G. S.). Однако можно получить линейный градуировочный гра-

Рис. 22.3. а: Секрция инсулина изолированными островками Лангерганса при введении глюкозы [23]. Обратите внимание на S-образную зависимость и плато при концентрациях глюкозы выше 10 ммоль/л.

б: Имплантируемый сенсор для искусственной поджелудочной железы имеет линейный отклик. Из-за отмеченного выше характера отклика природных бета-клеток линейность сигнала сенсора ограничивается концентрацией глюкозы 10 ммоль/л.

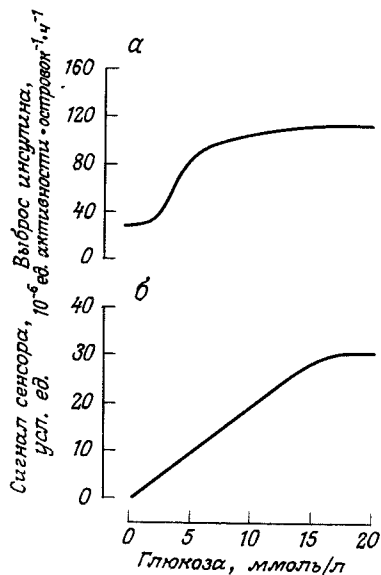
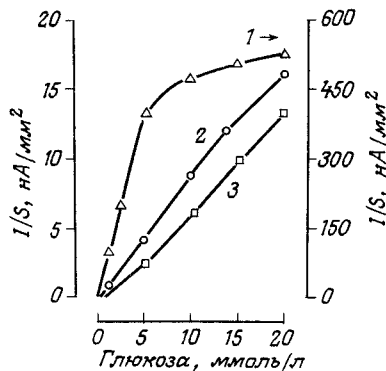


Рис. 22.4. Примеры градуировочных кривых глюкозных сенсоров с различными глюкозооксидазными мембранами (по неопубликованным данным Sternberg R., Tallagrand T., Thevenot D. R). 1 – GOD-коллагеновая мембрана; 2 – GOD-ацетилцеллюлозная; 3 – GOD-коллагеновая мембрана, покрытая тефлоновой мембраной со сквозными отверстиями. Обратите внимание, что использование дополнительной неферментной мембраны или ацетилцеллюлозной мембраны, с одной стороны, расширяет диапазон линейности системы, а с другой – понижает ее чувствительность.



фик и при значительно более высоких концентрациях, например до 20–30 ммоль/л, если замедлить поток глюкозы слабо проницаемой для нее мембраной. С этой целью можно использовать внешнюю мембрану поверх ферментной мембраны (рис. 22.4, кривая 3).

3. Время отклика меньше 10 мин*. Расчеты в рамках теоретической физиологической фармакокинетической модели глюкозного гомеостаза показали, что увеличение запаздывания отклика сенсора приводит к прогрессирующему ухудшению регуляции глюкозы, обострению гиперинсулинемии и возрастанию потребности в инсулине [45].

4. Независимость отклика сенсора от гидродинамики жидкости в сосудах и тканях*.

5. Независимость отклика сенсора от колебаний давления кислорода в окружении сенсора и расхода кислорода в самом сенсоре. Окисление глюкозы растворенным кислородом является необратимым процессом, который в стационарном состоянии контролируется либо реакцией ферментативного окисления, сильно зависящей от температуры (6–10%/град), либо диффузией субстрата, от температуры зависящей

слабо (2–4%/град) [27, 34]. При такой гетерогенной кинетике глюкозный электрод расходует столько кислорода, сколько выдается на монитор. Это является общим свойством кислородного сенсора Кларка (см. раздел 22.4.1). Независимо от способа связывания электрохимического детектора с глюкозооксидазной мембраной на стабильность его показаний влияет внешняя диффузия (т.е. скорость потока жидкости вблизи мембраны), внутренняя диффузия (т.е. проницаемость для субстратов), а также концентрация кислорода внутри или вблизи мембран. В идеальном случае эти факторы должны поддерживаться постоянными. В случае имплантированных глюкозных электродов эти идеальные условия обеспечить трудно. Кларковские кислородные детекторы с диаметром катода, приблизительно равным толщине мембраны (10–20 мкм), в меньшей мере зависят от гидродинамики, так как здесь имеет место полусферическая (а не одномерная) диффузия [3, 50]. Доступ субстратов и соответствующий уровень кислорода в ферментном слое можно косвенно контролировать с помощью дополнительной внешней мембраны с большей проницаемостью к кислороду, чем к глюкозе, и/или используя ферментные слои с высоким коэффициентом распределения кислорода.

6. Долгосрочная механическая, химическая и ферментативная стабильность глюкозооксидазы и ее носителя при 37 °С в цельной крови, лимфе или ткани.

7. Отсутствие утечки глюкозооксидазы в жидкости и ткани, окружающие сенсор; распознавание глюкозооксидазы иммунной системой как чужеродного фермента вызовет иммунную реакцию.

8. Биологическая совместимость всех непосредственно имплантируемых частей сенсора; отсутствие инкапсуляции последних фибробластами и гигантскими клетками*. Можно полагать [56], что для подкожно имплантируемого сенсора оптимальной является конфигурация проволоки или нити. Такая структура, если ее диаметр не превышает примерно 2 мм, будет вызывать минимальное раздражение ткани.

9. При уменьшении размеров сенсора не должны меняться характеристики (геометрические, физические и ферментативные), определяющие его аналитические свойства.

10. Минимальная градуировка и установка нуля*.

11. Наконец, длительный срок службы. Кроме того, сенсор должен легко заменяться при необходимости и при этом быть дешевым*. Для игольчатых сенсоров, частично вводимых в подкожную ткань, может быть приемлем срок службы в несколько дней, если не недель. Очевидно, что полностью имплантируемый прибор должен иметь значительно более длительный срок службы.

В следующих разделах этой главы дан обзор наиболее важных результатов, достигнутых при разработке глюкозных сенсоров, и их приложения в устройствах для введения инсулина с замкнутым контуром.

22.4. Электрохимические глюкозооксидазные сенсоры для искусственной поджелудочной железы: типы детекторов

22.4.1. Кислородные детекторы

Первый специфический глюкозный электрод был описан Кларком и Лайонсом в 1962 г. [12] (см. гл. 1). В этом электроде фермент удерживали на полимерной мембране и с помощью амперометрического кислородного электрода оценивали убыль кислорода по мере протекания реакции. Кислородные электроды типа электрода Кларка почти нечувствительны ко всем мешающим веществам. Они, однако, явно очень чувствительны к колебаниям парциального давления кислорода в жидкости, контактирующей с электродом. Таким образом, в условиях *in vivo* вполне вероятны ошибки в измерениях, обуславливаемые физиологическими и патологическими флук-

туациями давления кислорода. Эту проблему можно решить добавлением второго электрода без глюкозооксидазной мембраны, образующего вместе с глюкозооксидазным электродом дифференциальную систему [49].

Дальнейшая разработка этой системы [6] привела к созданию прототипа имплантируемого сенсора с двумя гальваническими кислородными электродами в качестве детектора. Кислород поступал на электрод через полипропиленовую мембрану, с внешней стороны закрепленную на носителе из нейлоновой ткани. В рабочем электроде к этому носителю с помощью глутарового альдегида ковалентно пришивали глюкозооксидазу. Все вместе заключали в пластиковом диске диаметром 2 см и толщиной 0,25 см. Срок службы сенсора *in vivo* составлял четыре дня, правда, его чувствительность к глюкозе не достигала оптимума, отчасти из-за низкого парциального давления кислорода в подкожных тканях [7].

Дополнительной проблемой при работе с сенсорами этого типа является (рис. 22.5, *a*) конкуренция за кислород между глюкозооксидазной мембраной (поток v_2) и самим кислородным детектором (поток v_1); если катод недостаточно мал, величина v_1 может влиять на кажущуюся активность глюкозооксидазы.

22.4.2. pH-детекторы

Известны разработки глюкозных сенсоров на основе детектирования глюконовой кислоты с помощью pH-электрода. Однако такие сенсоры демонстрируют неудовлетворительную чувствительность, избирательность и линейность градуировочных кривых [33], и, таким образом, их нельзя использовать в сильно буферированных жидкостях организма.

22.4.3. Амперометрические детекторы пероксида водорода

Наиболее хорошо разработанным типом глюкозных сенсоров являются сенсоры с амперометрическим детектированием образующегося в ферментативной реакции пероксида водорода [21, 38, 48] (рис. 22.5, *б*). Авторы [13] приспособили один из таких сенсоров для прикреватного устройства искусственной поджелудочной железы. Аналогичные сенсоры использовались в тех же целях еще несколькими группами исследователей (см. раздел 22.7). За последние десять лет были внесены усовершенствования в конструкцию сенсора, способ связывания фермента с его подложкой и функциональные характеристики электродов.

К глюкозе детекторы этого типа очень чувствительны; предел обнаружения у них может достигать 10 нмоль/л [48]. Амперометрический детектор пероксида водорода весьма чувствителен также к природным донорам электрода, таким как аскорбат, урат

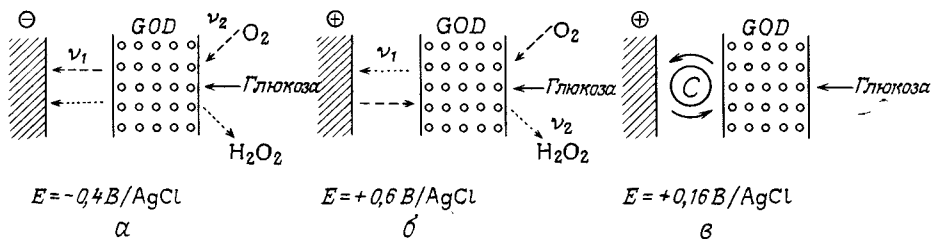
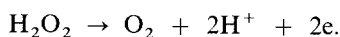


Рис. 22.5. Типы детекторов, используемых в глюкозооксидазных электрохимических сенсорах для искусственной поджелудочной железы. а: детектор катодного восстановления кислорода; б: детектор анодного окисления пероксида водорода; в: кофакторный детектор. Пояснения см. в тексте.

и тирозин. В связи с этим разрабатываются методы повышения избирательности глюкозного электрода, чтобы избежать влияния мешающих веществ. Эти методы заключаются либо в компенсации сигнала с помощью неферментного детектора [48], либо в покрытии платинового анода селективно проницаемыми мембранами (например, ацетилцеллюлозной) с порами, которые исключали бы прохождение аскорбата и большинства других потенциально мешающих веществ [57].

Независимость функционирования детектора пероксида водорода от концентрации кислорода является важным преимуществом при конструировании сенсора. Тем не менее следует учитывать локальную концентрацию кислорода, необходимую для протекания ферментативной реакции: в этом смысле распределение и коэффициент диффузии кислорода в мембране может играть важную роль в формировании отклика сенсора на глюкозу. При электрохимическом окислении пероксида водорода на поверхности платины кислород регенерирует по реакции



Оптимизация накопительной способности детектора (рис. 22.5, б), т.е. отношения между окисляемой на платине долей (v_1) пероксида водорода, генерируемого в ферментативной реакции, и общим потоком пероксида водорода, $v_1 + v_2$ (где v_2 — доля пероксида водорода, диффундирующая в объем раствора), выражалась бы в обеспечении большей доступности ферментного слоя для кислорода и большей независимости от диффузии кислорода из омывающей жидкости после начала реакции [14].

Наконец, анодное окисление пероксида водорода не всегда контролируется диффузией, и его скорость может ограничивать сигнал сенсора. Скорость окисления может зависеть от предварительной обработки электрода [16].

22.4.4. Потенциометрическое детектирование пероксида водорода

Принцип потенциометрического определения концентрации глюкозы реализован в сенсоре, предложенном в работе [39] (см. также гл. 10). Глюкозооксидазу иммобилизуют непосредственно на поверхности платинового рабочего электрода; методика иммобилизации включает удерживание в полиакриламидном геле, сшивание глутаровым альдегидом в альбуминовом носителе или связывание с платиной через гамма-аминопропилтриэтоксисилан [55].

В отличие от амперометрического детектирования, при котором на электроды накладывают внешний потенциал и контролируют локальные концентрации кислорода и пероксида водорода непосредственно по генерируемому току, при потенциометрическом детектировании измеряют псевдоравновесный потенциал исследуемой системы. Электрохимическая реакция, определяющая этот потенциал, является результатом взаимодействия между генерируемым в ферментативной реакции пероксидом водорода и поверхностью платины [54]. Функционирование данной системы всегда критическим образом зависит от процедуры очистки электрода. При исследованиях *in vitro* отклик потенциометрического сенсора линейно зависел от логарифма концентрации глюкозы в диапазоне от 0,6 до 22 ммоль/л. Теоретически преимущества этой системы для использования *in vivo* связаны с низким значением генерируемого потенциала и заключаются в минимуме электрохимических помех и возможности миниатюризации электрода.

22.4.5. Детекторы кофакторов

Концепция детектирования кофакторов базируется на способности кофакторов действовать как временные акцепторы протонов и электронов, высвобождаемых при

окислении субстратов окислительно-восстановительными ферментами (гл. 15). Общий принцип состоит в том, чтобы создать твердый электрод, в котором природные или искусственные кофакторы были бы составной частью электронпроводящей подложки и фермент иммобилизовался с кофактором. Такой электрод в целом должен вести себя как кофактор, т.е. в ферментативной реакции выступать как акцептор или донор электронов (рис. 22.5, в).

Описано сопряжение рибофлавина с поверхностью углеродного электрода [51], облегчающее перенос электрона. Дальнейшая разработка этой системы заключалась в превращении иммобилизованного рибофлавина в FAD, что приводило к возникновению ферментативной активности при добавлении апофермента глюкозооксидазы [52]. Позже авторы [11] использовали иммобилизованные производные ферроцена (ионы феррициния), которые могли электрохимически окисляться и взаимодействовать с восстановленной глюкозооксидазой. При избытке таких реагентов подача кислорода в каталитический слой слабо влияет на скорость ферментативной реакции (см. гл. 15 и 16). Недавно описан [25] глюкозный сенсор с бензохиноном в качестве кофактора. Глюкозооксидазу удерживали на поверхности *n*-бензохинон-углеродного пастового электрода с помощью нитроцеллюлозной пленки. Такой сенсор с электрокаталитическим окислением глюкозы характеризуется диапазоном линейности отклика до 15 ммоль/л, временем отклика около 20 с и нечувствительностью к колебаниям давления кислорода в исследуемых растворах.

22.5. Конструкции глюкозооксидазных *in vivo* сенсоров

В новейших разработках, направленных на создание имплантируемых глюкозных сенсоров, отдают предпочтение трем конструктивным типам сенсоров: плоским, проточным и игольчатым. Основными частями сенсоров с плоской конфигурацией являются плоская подложка, на которой размещены рабочий металлический электрод, противозлектрод и электрод сравнения, покрытые в различных сочетаниях ферментными и неферментными, гидрофильными и гидрофобными мембранами. Такие мембраны служат носителями фермента, средой, в которой протекает химическая реакция, и выступают в роли диффузионного барьера, обеспечивающего оптимальные концентрации глюкозы и кислорода в этой среде. Авторы [17] описали плоский сенсор, помещенный в проточную камеру. Сенсор состоял из платинового анода для детектирования пероксида водорода, хлоридсеребряных электрода сравнения и противозлектрода, глюкозооксидазы, иммобилизованной на сефарозе и удерживаемой гидрофильными ацетицеллюлозными мембранами, и гидрофобной пористой тефлоновой мембраны перед анодом. Испытание *in vivo* на нормальных и больных диабетом собаках дало удовлетворительную корреляцию между показаниями сенсора и стандартными значениями содержания глюкозы в плазме при времени отклика от 90 до 120 с. При градуировке *in vitro* линейный диапазон простирался до концентрации глюкозы 40 ммоль/л.

Оригинальная конструкция описана в работе [28]: сенсор представляет собой устройство в виде сосуда, через который течет кровь. Кислородные электроды и мембраны расположены на внутренних стенках сосуда. Сенсор включается в кровеносную систему наподобие внешнего артериовенозного шунта для гемодиализа. Диапазон линейности отклика сенсора доходит до концентрации глюкозы 16 ммоль/л, а время отклика составляет около 10 мин.

Сенсоры игольчатого типа обычно представляют собой микроэлектроды, включающие платиновый стержень (анод), изолированный от внешних хлоридсеребряных электрода сравнения и противозлектрода. Электрод покрывают глюкозооксидазой,

иммобилизованной в растворе носителя (например, диацетилцеллюлозы) в летучем растворителе (например, ацетоне).

Описан также [4] (гл. 23) имплантируемый под кожу сенсор игольчатого типа со временем отклика *in vivo* 2–5 мин и линейным откликом до концентрации глюкозы 27 ммоль/л (см. раздел 22.7).

22.6. Глюкозные сенсоры: альтернативные подходы

Глюкозные сенсоры, в которых не используются ферменты, известны уже давно. Хотя они претендуют на устранение трудностей, связанных с гетерогенной ферментативной кинетикой, в настоящее время ни одна из этих систем не разработана настолько, чтобы ее можно было имплантировать *in vivo*.

В ряде работ [19, 36, 44] исследовали характеристики электрохимических сенсоров прямого действия, состоящих из платиновых электродов, не связанных с глюкозооксидазой. Сигнал генерируется в результате прямого анодного окисления глюкозы на поверхности платинового электрода при попеременном наложении на последний анодного и катодного потенциалов. В биологических жидкостях избирательность таких сенсоров к глюкозе далека от оптимальной из-за мешающего влияния эндогенных окисляемых веществ, таких как аминокислоты, мочевины, аскорбиновая кислота, а также экзогенных веществ, например спирта и некоторых лекарств. Подбор рабочих потенциалов и использование внешней селективной мембраны существенно улучшает избирательность. Дополнительной проблемой при работе с детектором этого типа является отравление поверхности платины в результате адсорбции глюконовой кислоты и аминокислот, что приводит к постепенной инактивации анодного катализатора и ингибированию дальнейшего окисления. Инактивации можно избежать, регенерируя рабочий электрод периодическим импульсным электрохимическим окислением поверхности. Вместе с продуктами окисления электрода на нем генерируются и десорбируются оксидные радикалы. Нынешнее состояние электрокаталитического глюкозного сенсора не позволяет использовать его в качестве имплантируемого прибора.

Представляет интерес сенсор [40], основанный на принципе конкуренции глюкозы и меченого флуоресцентом полидекстрана за связывание с белком конканавалином А, иммобилизованным на внутренней поверхности полой диализной трубки (гл. 32). Конструкция этого аффинного сенсора включает оптическое волокно, вставленное в диализную трубку, что позволяет непосредственно определять несвязанный меченый декстран. Преимуществом данного сенсора по сравнению с глюкозооксидазными сенсорами является то, что его сигнал определяется конкурентным равновесием между глюкозой и формирующим сигнал лигандом. Поэтому кинетика ферментативных реакций и загрязнение электрода не влияет на величину сигнала. Оптимальной избирательности и чувствительности такого сенсора можно достичь подбором соответствующих связывающего белка и конкурентного лиганда; например, можно было бы использовать специфические антитела. При использовании сенсора *in vivo* его недостатками являются все еще ограниченная стабильность и относительно большое время отклика.

Авторами [31] предложен принцип неинвазивного мониторинга глюкозы в водянистой влаге глаза, основанный на измерении угла оптического вращения, обуславливаемого локальной концентрацией глюкозы. Для этого, однако, требуется довольно громоздкое оптическое оборудование, что является серьезным недостатком при разработке портативного прибора.

В ферментном глюкозном сенсоре можно было бы использовать несколько эндогенных ферментов, для которых глюкоза является первичным субстратом. К ним относятся глюкозодегидрогеназа, глюкокиназа, глюкозо-6-фосфатаза и глюкозоизо-

мераза [53]. В случае глюкозодегидрогеназы можно контролировать концентрацию NAD^+/NADH , используя миниатюрный волоконно-оптический спектрометр. В настоящее время эта система разработана лишь в теории.

В этом и нескольких предыдущих разделах главы мы рассматривали глюкозный сенсор как часть системы введения инсулина с замкнутым контуром. Основные характеристики некоторых имплантируемых сенсоров приведены в табл. 22.2.

Таблица 22.2. Основные характеристики некоторых имплантируемых глюкозных сенсоров

Характеристика	По данным			
	[6-8]	[17, 18]	[28]	[41, 42]
Тип детектора	Гальванический элемент	Pt анод/ H_2O_2	O_2 -электрод Кларка	Pt анод/ H_2O_2
Материал мембраны для иммобилизации фермента	Найлон	Сефароза	Найлон	Ацетилцеллюлоза
Методика иммобилизации	Ковалентное связывание глутаровым альдегидом	Ковалентное связывание цианогенбромидом	Ковалентное связывание глутаровым альдегидом	Ковалентное связывание глутаровым альдегидом
Материал неферментной мембраны (1)	Полипропилен	Ацетилцеллюлоза	Полипропилен	Полиуретан
Материал неферментной мембраны (2)		Пористый тефлон	Пористый тефлон	Поливиниловый спирт
Геометрия сенсора	Плоский	Плоский	Проточный сосуд	Игольчатый

22.7. Искусственная поджелудочная железа

Первое внешнее электромеханическое устройство, используемое в качестве системы ввода инсулина с замкнутым контуром, было создано в 1964 г. [26]. Всякий раз, когда содержание глюкозы в крови превышало 1,5 г/л (8,33 ммоль/л) или падало ниже 0,5 г/л (2,77 ммоль/л), в кровь вводили соответственно инсулин или глюкагон. Однако такая система не могла нормализовать гликемию. Возрождение в 70-х годах интереса к этому прикроватному прибору, известному как искусственная поджелудочная железа, привело к усовершенствованию систем обратной связи, управляющих введением инсулина. В работе [2] контроль подачи инсулина был возложен на компьютер, рассчитывавший количество вводимого инсулина с учетом ежеминутных вариаций уровня сахара в крови. В 1977 г. Клеменс и сотр. сконструировали первое устройство этого типа для серийного выпуска - Biostator Glucose-Controlled Insulin Infusion System (60 кг, 42 × 46 × 46 см). С тех пор различными группами исследователей были изготовлены и усовершенствованы аналогичные устройства, функционирующие как бета-клетки поджелудочной железы, с использованием экстракорпоральных глюкозных сенсоров [18, 19, 29, 32, 43].

В работе [7] описана имплантация страдающей диабетом собаке небольшой искусственной поджелудочной железы, состоящей из глюкозного сенсора с кислородным детектором, электронного блока, микронасоса и источника питания. Сенсор аналогичен рассмотренному в разделе 22.4.1. Насос представлял собой пьезоэлектрический прибор, отделенный от резервуара с инсулином соленоидным клапаном. Инсулин вводился в брюшную полость при синхронной подаче импульсов на насос и клапан. Однако в этих экспериментах, как и в дополнительных опытах на семи собаках

[8], инсулина вводилось явно недостаточно из-за неадекватного отклика глюкозного сенсора на содержание глюкозы.

Примечательным достижением в смысле миниатюризации явился разработанный авторами [41] прибор для постоянного ношения (400 г, 12 × 15 × 6 см) с замкнутым контуром и имплантируемым игольчатым сенсором. С помощью этого прибора обеспечивается краткосрочный контроль гликемии у больных диабетом [42] (см. гл. 23).

22.8. Заключение

В последние годы углубилось понимание физиологических, физико-химических и электрохимических процессов, что позволило сформулировать основные требования к глюкозным сенсорам, предназначенным для работы *in vivo*. Это понимание уже начало приносить свои плоды и в области технологии. Однако ряд вопросов все еще остаются без ответа, а некоторые решенные проблемы не нашли практического воплощения.

Что касается функционирования сенсора при имплантации *in vivo*, то необходимо оптимизировать взаимное расположение глюкозооксидазного слоя и защитных мембран, чтобы обеспечить долговременную стабильность фермента и достаточные локальные концентрации глюкозы и кислорода при минимальном раздражении ткани. Углубленное представление о функционировании сенсоров, как *in vitro*, так и *in vivo* позволит оптимизировать их конструкцию и рабочие характеристики.

Могут оказаться ценными и другие подходы к созданию сенсоров, отличных от сенсора на основе глюкозооксидазы. Хорошие перспективы могут быть, например, у аффинных сенсоров. В имплантируемых устройствах обычно необходим мембранный барьер между чувствительным элементом и биологической жидкостью. Ясно, что неспособность таких мембран поддерживать воспроизводимые параметры транспорта определяемого вещества является основной причиной отказа биосенсорных устройств.

И наконец, надежды, вызываемые созданием надежного сенсора для длительной работы в портативной системе введения инсулина с замкнутым контуром, оправдывают усилия, затрачиваемые на продолжение этих исследований. Можно надеяться, что облегчение контроля гликемии станет важным шагом в предотвращении осложнений вследствие диабетической болезни.

Благодарности

Авторы глубоко признательны Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs salaries, Франция (грант CNAMIS-INSERM 85.3.54.8.E), National Institute of Health, США (грант AM 30718) и Association des Yeunes Diabetiques, Париж, Франция, за поддержку этой работы. Кроме того, д-р Гилберто Велхо благодарен за поддержку С. N. Pq.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Albisser A. M., Spencer W. J.* Electronics and the diabetic. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **29**, 239-48 (1982).
2. *Albisser A. M., Leibel B. S., Ewart G., Davidovac Z., Botz C. K., Zingg W.* An artificial endocrine pancreas. *Diabetes*, **23**, 389-96 (1974).
3. *Bard A. J., Faulkner L. R.* Mass transfer by migration and diffusion. In *Electrochemical methods. Fundamentals and applications* (eds. A. J. Bard., L. R. Faulkner), pp. 119-35. Wiley, New York, 1980.
4. *Barman T. E.* Glucose oxidase. In *Enzyme handbook* (ed. T. E. Barman), Vol. 1, pp. 112-113. Springer-Verlag, Berlin, 1969.
5. *Bennett P. H.* Diabetes in developing countries and unusual populations. In *Diabetes in epidemiologi-*

- cal perspective (eds. J.I. Mann, K. Pyorala, A. Teuscher), pp. 43–57. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983.
6. *Bessman S. P., Schultz R. D.* Prototype glucose-oxygen sensor for the artificial pancreas. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, **19**, 361–4 (1973).
 7. *Bessman S. P., Hellyer J. M., Layne E. C., Takada G., Thomas L. J., Jr., Sayler D.* The total implantation of an artificial β -cell in a dog: Progress report. *Diabetes, Excerpta Medica-International Congress Series*, **413**, 496–501 (1977).
 8. *Bessman S. P., Thomas L. J., Kojima H., Sayler D. F., Layne E. C.* The implantation of a closed loop artificial beta cell in dogs. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, **27**, 7–17 (1981).
 9. *Brennan J. R., Gebhart S. S. P., Blackard W. G.* Pump-induced insulin aggregation: a problem with the Biostator. *Diabetes*, **34**, 353–9 (1985).
 10. *Calabrese G., Buetti A., Zega G., Giombolini A., Bellomo G., Antonella M. A., Massi-Benedetti M., Brunetti P.* Improvement of artificial endocrine pancreas (Biostator; GCIS) performance combining feedback controlled insulin administration with a pre-programmed insulin infusion. *Horm. Metabol. Res.*, **14**, 505–7 (1982).
 11. *Cass A. E. G., Davis G., Francis G. D., Hill H. A. O., Aston W. J., Higgins I. J., Plotkin E. V., Scott L. D. L., Turner A. P. F.* Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.*, **56**, 667–71 (1984).
 12. *Clark L. C., Jr., Lyons C.* Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**, 29–46 (1962).
 13. *Clemens A. H., Chang P. H., Myers R. W.* The development of Biostator, a glucose controlled insulin infusion system (GCIS). *Horm. Metab. Res. suppl.*, **7**, 23–33 (1977).
 14. *Coulet P. R., Sternberg R., Thévenot D. R.* Electrochemical study of reactions at interfaces of glucose oxidase collagen membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **612**, 317–27 (1980).
 15. *Dimitriadis G. D., Gerich J. E.* Importance of timing of preprandial subcutaneous insulin administration in the management of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **6**, 374–7 (1983).
 16. *Dubois C.* Caractérisation électrochimique des membranes utilisées dans les électrodes à enzymes. D.E.A. de Cinétique Chimique Appliquée. Université Pierre et Marie Curie, Paris, 1984.
 17. *Fischer U., Abel P.* A membrane combination for implantable glucose sensors. Measurements in undiluted biological fluids. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **28**, 245–8 (1982).
 18. *Fischer U., Jutzi E., Bombor H., Freyse E. J., Salzsieder E., Albrecht G., Besch W., Bruns W.* Assessment of an algorithm for the artificial β -cell using the normal insulin-glucose relationship in diabetic dogs and men. *Diabetologia*, **18**, 97–107 (1980).
 19. *Gebhardt U., Luft G., Richter G. J., Von Sturm F.* Development of an implantable electrocatalytic glucose sensor. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **5**, 607–24 (1978).
 20. *Goriya Y., Kawamori R., Shichiri M., Abe H.* The development of an artificial beta cell system and its validation in depancreatized dogs: the physiological restoration of blood glucose homeostasis. *Med. Prog. Technol.*, **6**, 99–108 (1979).
 21. *Guilhaut G. G., Lubrano G. J.* An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Anal. Chim. Acta*, **64**, 439–45 (1973).
 22. *Hamman R. F.* Diabetes in affluent societies. In *Diabetes in epidemiological perspective* (eds. J.I. Mann, K. Pyorala, A. Teuscher), pp. 7–42. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983.
 23. *Harrison D. E., Christie M. R., Gray D. W. R.* Properties of isolated human islets of Langerhans: insulin secretion, glucose oxidation and protein phosphorylation. *Diabetologia*, **28**, 99–103 (1985).
 24. *Horwitz D. L., Zeidler C., Gonen B., Jaspan J. B.* Hyperinsulinism complicating control of diabetes mellitus by an artificial beta cell. *Diabetes Care*, **3**, 274–7 (1980).
 25. *Ikeda T., Hamada H., Miki K., Senda M.* Glucose oxidase immobilized benzoquinone-carbon paste electrode as a glucose sensor. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 541–3 (1985).
 26. *Kadish A.* Automation control of blood sugar. A servomechanism for glucose monitoring and control. *Am. J. Med. Electron.*, **3**, 82–6 (1964).
 27. *Kamin R., Wilson G. S.* Rotating ring-disk enzyme electrode for biocatalysis kinetic studies and characterization of the immobilized enzyme layer. *Anal. Chem.*, **52**, 1198–205 (1980).
 28. *Kondo T., Kojima H., Ohkura K., Ikeda S., Ito K.* Trial of new vessel access type glucose sensor for implantable artificial pancreas in vivo. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, **27**, 250–3 (1981).
 29. *Kraegen E. W., Whiteside R., Bell D., Chia Y. O., Lazarus L.* Development of a closed-loop artificial pancreas. *Horm. Metab. Res. suppl.*, **8**, 38–42 (1979).
 30. *Lougheed W. D., Woulfe-Flanagan H., Clement I. R., Albisser A. M.* Insulin aggregation in artificial delivery systems. *Diabetologia*, **19**, 1–9 (1980).
 31. *March W., Engerman R., Rabinovitch B.* Optical monitor of glucose. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs.*, **25**, 28–31 (1979).
 32. *Mirouze J., Selam J. L., Pham T. C., Cavadore D.* Evaluation of exogenous insulin homeostasis by the artificial pancreas in insulin dependent diabetes. *Diabetologia*, **13**, 273–8 (1977).

33. Nilson H., Akertind A.C., Mosbach K. Determination of glucose, urea and penicillin using enzyme-pH electrodes, *Biochim. Biophys. Acta*, **320**, 529-34 (1973).
34. Racine P., Mindt W. On the role of substrate diffusion in enzyme electrodes. *Experientia suppl.*, **18**, 524-34 (1971).
35. Report of the National Commission on Diabetes to the Congress of the United States. U.S. Dep. Health, Educ., Welfare, Public Health Service, Nat. Inst. of Health, DHEW Publication No. (NIH) 76, 1021-8 (1976).
36. Richter G.J., Luft G., Gebhardt U. Development and present status of an electrocatalytic glucose sensor. *Diabetes Care*, **5**, 224-8 (1982).
37. Rizza R.A., Gerich J.E., Haymond M.W., Westland R.E., Hall L.D., Clemens A.H., Service F.J. Control of blood sugar in insulin dependent diabetes: comparison of an artificial endocrine pancreas, continuous subcutaneous insulin infusion, and intensified conventional insulin therapy. *N. Engl. J. Med.*, **303**, 1313-8 (1980).
38. Scheller F., Janchen M., Pfeiffer D., Seyer I., Muller K. Enzymelektrode zum Nachweis von Glucose. *Z. Med. Labor. Diagn.*, **18**, 312-16 (1977).
39. Schiller J.G., Wingard L.B., Jr., Liu C.C. Potentiometric detection of hydrogen peroxide and apparatus therefore. U.S. Patent, **4**, 340, 448, 1982.
40. Schultz J.S., Mansouri S., Godstein I.J. Affinity sensors: a new technique for developing implantable sensors for glucose and other metabolites. *Diabetes Care*, **5**, 245-53 (1982).
41. Shichiri M., Yamasaki Y., Kawamori R., Hakui N., Abe H. Wearable artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor. *Lancet*, **2**, 1129-31 (1982).
42. Shichiri M., Kawamori R., Hakui N., Yamasaki Y., Abe H. Closed-loop glycaemic control with a wearable artificial endocrine pancreas. Variation in daily insulin requirements to glycaemic responses. *Diabetes*, **33**, 1200-2 (1984).
43. Slama G., Klein J.C., Tardieu M.C., Tchobroutsky G. Normalisation de la glycémie par pancréas artificiel miniaturisé. Application pendant 24 heures chez 7 diabétiques insulino-dépendants. *Nouv. Presse Med.*, **6**, 2309-15 (1977).
44. Soeldner J.S., Chang K.W., Aisenberg S., Hiebert J.M. Progress towards an implantable glucose sensor and an artificial beta cell. In *Temporal aspects of therapeutics* (eds. J. Urquhart, F.E. Yates), pp. 181-207. Plenum Press, New York-London, 1973.
45. Sorensen J.T., Colton C.K., Hillman R.S., Soeldner J.S. Use of a physiologic pharmacokinetic model of glucose homeostasis for assessment of performance requirements for improved insulin therapies. *Diabetes Care*, **5**, 148-57 (1982).
46. Tchobroutsky G. Relation of diabetic control to development of microvascular complications. *Diabetologia*, **15**, 143-52 (1978).
47. Thévenot D.R. Problems in adapting a glucose oxidase electrochemical sensor into an implantable glucose-sensing device. *Diabetes Care*, **5**, 184-9 (1982).
48. Thévenot D.R., Coulet P.R., Sternberg R., Gautheron D.C. A highly sensitive glucose electrode using glucose oxidase collagen film. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **5**, 548-53 (1978).
49. Urdike S.J., Hicks G.P. The enzyme electrode. *Nature*, **214**, 986-8 (1967).
50. Wightman R.M. Microvoltametric electrodes. *Anal. Chem.*, **53**, 1125-34A (1981).
51. Wingard L.B., Jr. Possibility for an immobilised flavin fuel cell electrode for glucose measurement. *Diabetes Care*, **5**, 222-3 (1982).
52. Wingard L.B., Jr. Prospects for electrochemical devices and processes based on biotechnology. In *Biotech 83*, pp. 613-24. Online Publications Ltd., Northwood, UK, 1983.
53. Wingard L.B., Jr. Immobilized enzyme electrodes for glucose determination for the artificial pancreas. *Federation Proc.*, **42**, 288-291 (1983).
54. Wingard L.B., Jr., Liu C.C., Wolfson S.K., Yao S.J., Drash A.L. Potentiometric measurement of glucose concentration with an immobilized glucose oxidase/catalase electrode. *Diabetes Care*, **5**, 199-202 (1982).
55. Wingard L.B., Jr., Schiller J.G., Wolfson S.K., Liu C.C., Drash A.L., Yao S.J. Immobilized enzyme electrodes for the potentiometric measurement of glucose concentration: immobilization techniques and materials. *J. Biomed. Mater. Res.*, **13**, 921-35 (1979).
56. Woodward S.C. How fibroblasts and giant cells encapsulate implants: considerations in design of glucose sensors. *Diabetes Care*, **5**, 278-81 (1982).
57. Instruction manual Y.S.I. model 23 A. Yellow Spring Instruments Co, 1975.

Игольчатые глюкозные сенсоры и их клиническое применение

Мотояки Шичири, Рюзо Кавамори, Ёшимцу Ямасаки

23.1. Введение

В литературе описано несколько типов глюкозных сенсоров, но только некоторые из них могут быть применены в клинике *in vivo*. В работе [4] предложен дисковый электрохимический (не ферментный) глюкозный сенсор, который, будучи имплантирован в подкожную ткань обезьяны резус, на 117-й день давал отклик, хорошо коррелировавший с уровнем сахара в венозной крови при внутривенном введении глюкозы [20]. Этот сенсор, однако, не применяется для мониторинга организма человека *in vivo*, так как на его отклик влияют многие посторонние электрохимически активные частицы [6].

Совершенно иная ситуация сложилась с глюкозными сенсорами на основе глюкозооксидазы [7, 21]. Такие сенсоры обладают высокой специфичностью по отношению к глюкозе и используются для точного определения глюкозы как *in vitro*, так и *in vivo*. Первый пригодный для имплантации глюкозный сенсор состоял из двух гальванических кислородных электродов, помещенных в искусственную поджелудочную железу с замкнутым контуром [3]. В ходе испытаний все узлы этой системы функционировали достаточно хорошо, но установить полный контроль над организмом животного с ее помощью не удавалось отчасти потому, что глюкозные сенсоры были нечувствительны к концентрации глюкозы в ткани, показывая примерно половину от ожидаемого уровня. Об использовании глюкозного сенсора этого типа для мониторинга организма человека не сообщалось.

Авторами данной главы разработан [18, 19] глюкозный сенсор игольчатого типа, характеристики которого *in vivo* и *in vitro* позволяют применять его для мониторинга глюкозы в тканях. Использование такого сенсора в качестве чувствительного элемента в портативной искусственной поджелудочной железе с замкнутым контуром обеспечивает у больных диабетом регуляцию гликемии в течение шести дней и более [17].

23.2. Принцип определения глюкозы с помощью введенного в организм глюкозного сенсора

В присутствии глюкозы и кислорода используемая в ферментных глюкозных сенсорах глюкозооксидаза катализирует окисление глюкозы с образованием глюконовой кислоты и пероксида водорода. Поскольку физиологическая концентрация кислорода в крови или тканевой жидкости намного меньше [2], чем значение K_M для данного фермента [5], скорость окисления регулируется не только концентрацией глюкозы, но и парциальным давлением кислорода. Отсюда, в частности, следует, что отклик имплантированного сенсора может нелинейно зависеть от концентрации глюкозы [3]. Для решения этой проблемы было предложено [9, 23] закрыть сенсор мембраной, более проницаемой для кислорода, чем для глюкозы, и тем самым ограничить доступ глюкозы в ферментный слой сенсора. Выходной сигнал сенсора с такой мембраной является линейным в широком диапазоне концентрации глюкозы и нечувствителен к флуктуациям давления кислорода.

Что же касается реакции организма на имплантируемый сенсор, то здесь существенное значение имеют также размеры и конфигурация сенсора. Реакция организма минимальна, если сенсор изготовлен в виде проволоки или нити диаметром меньше 2 мм [22]. Следовательно, в отличие от диска миниатюрная игла является идеальной конструктивной формой для вживляемого глюкозного сенсора.

В табл. 23.1 наряду с характеристиками *in vitro* приведены мембраны и конструктивные особенности описанных в литературе имплантируемых глюкозных сенсоров.

Таблица 23.1. Ферментные глюкозные сенсоры, используемые для мониторинга *in vivo*

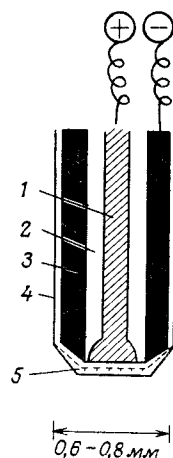
Характеристики сенсоров	Сенсоры, разработанные в		
	Калифорнии [3, 12]	Нагое [19]	Осаке [17-19]
Форма	Дискообразный	Трубчатый	Игольчатый
Размер	Диаметр 20 мм, глубина 2 мм	—	Диаметр 0,4–0,8 мм, длина 20 мм
Полупроницаемая мембрана	—	Полипропилен	Полиуретан
Мембрана, несущая фермент	Найлон	Найлоновый фильтр Millipore	Диацетилцеллюлоза
Газопроницаемая мембрана	Полипропилен	Тефлон	—
Определяемое электрохимически активное вещество	O ₂	O ₂	Пероксид водорода
Анод	Pb	Ag	Pt
Катод	Ag	Pt	Ag
Электродит	КОН	NaCl	Физиологический раствор
Диапазон определяемых концентраций глюкозы, ммоль/л	0-8,3	0-38,5	0-27,5
Место имплантации	Подкожная ткань	Кровеносные сосуды	Кровеносные сосуды, подкожная ткань
Объекты мониторинга <i>in vivo</i>	Кролик, собака	Собака, человек	Собака, человек
Контрольные опыты	Собака с диабетом, вызванным стрептозотоцином	Собака с удаленной поджелудочной железой	Собака с удаленной поджелудочной железой; люди, больные диабетом

23.3. Изготовление глюкозного сенсора игольчатого типа

Датчик, чувствительный к пероксиду водорода, изготавливают согласно методике, описанной в работе [8] и модифицированной следующим образом. Кончик платиновой проволоки диаметром 0,2 мм, длиной 4 см оплавливают в пламени кислород-природный газ, пока он не примет форму шарика (диаметром 0,3–0,7 мм). Затем проволочку заправляют в мягкий стеклянный капилляр, который также плавят в кислородном пламени газовой горелки. После этого кончик электрода полируют тонкой шкуркой (№ 2000) до тех пор, пока не очистится поверхность пластины (анод). Платиново-стеклянный анод вставляют в посеребренную трубку из нержавеющей стали (внутренний диаметр 0,4 мм, длина 2 см), служащую в датчике катодом. Всю конструкцию плотно фиксируют нагреванием в кислородном газовом пламени.

Кончик электрода погружают на 5 с в 1%-ный раствор диацетилцеллюлозы (фирма Eastman Kodak, США) в смеси (1:1) ацетона и этанола и затем экспонируют 5 мин в парах ацетона. Эту процедуру повторяют дважды. Далее кончик погружают на 30 с в 2,5%-ный раствор диацетилцеллюлозы в смеси (1:1) ацетона и этанола. 0,2 мкл предварительно приготовленного раствора глюкозооксидазы (50 мг глюкозооксидазы из *Aspergillus niger*, типа II, 17300 ед. активности/г,

Рис. 23.1. Схема глюкозного сенсора игольчатого типа: 1 – Pt анод; 2 – стекло; 3 – Ag катод; 4 – полиуретан; 5 – диацетилцеллюлозная мембрана с иммобилизованной глюкозооксидазой.



фирмы Sigma Chemical, США, растворяют в 1 мл дистиллированной воды) капают на кончик электрода, повернутого смоченным концом вверх. Для иммобилизации глюкозооксидазы туда же капают 0,1 мкл 2%-ного раствора глутарового альдегида (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Япония). Электрод выдерживают на воздухе в течение 2 ч при 25 °С и затем экспонируют 5 мин в парах ацетона также при 25 °С. Кончик погружают на 2 с в 2%-ный раствор полиуретана (Japan Erastran Co., Япония) в тетрагидрофуране (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Япония), после чего сушат на воздухе. Далее кончик погружают еще на 10 с в 15%-ный раствор полиуретана в смеси (1:1) тетрагидрофурана и диметилформамида (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Япония). До начала работы изготовленный таким способом глюкозный сенсор игольчатого типа (рис. 23.1) хранят в холодильнике.

23.4. Характеристики глюкозного сенсора *in vitro*

23.4.1. Методика определения характеристик сенсора *in vitro*

Игольчатый глюкозный сенсор, поляризованный при +0,6 В, соединяют с усилителем тока (POG-200А, фирмы Unic Medical Co., Ltd., Япония), который преобразует ток 1 мА в напряжение 100 мВ. Для регистрации сигнала сенсора используют перьевой самописец (VP6621А, Matsushita Communication Industrial Co., Япония).

Характеристики сенсора *in vitro* определяют в 0,9%-ном растворе NaCl, содержащем 7% бычьего альбумина (фракция V, фирма Miles, США). Испытания проводят при различных концентрациях глюкозы в термостатируемой камере с регулируемой скоростью потока и давления кислорода. Градуировку по выходному току сенсора проводят после его стабилизации, которая занимает по меньшей мере 10 мин.

23.4.2. Дрейф и шум при измерениях

Дрейф базовой (нулевой) линии и уровень шума сенсора выражают как процентное изменение выходного тока сенсора по отношению к его отклику в 5,5 мМ растворе глюкозы. Дрейф базовой линии обычно составлял $0,8 \pm 0,3\%$ за 24 ч, а шум находился в диапазоне $0,3 \pm 0,4\%$. Остаточный ток в не содержащем глюкозы солевом растворе составлял $1,3 \pm 0,6\%$ (табл. 23.2).

Таблица 23.2. Типичные характеристики игольчатого глюкозного сенсора *in vitro*

Характеристика сенсора	Численное значение
Остаточный ток, %	$1,3 \pm 0,6$
Дрейф базовой линии, %/24 ч	$0,8 \pm 1,3$
Уровень шума, %	$0,3 \pm 0,4$
Сигнал, генерируемый при концентрации глюкозы 5,5 ммоль/л, нА	$1,2 \pm 0,4$
Диапазон концентраций глюкозы, в котором градуировочный график линеен, ммоль/л	0–27,5
Время отклика сенсора (достижения 90%-ного уровня сигнала) $T_{90\%}$, с	$16,2 \pm 6,2$
Температурный коэффициент, %/град	$2,3 \pm 1,0$

Примечание: приведенные результаты представляют собой среднее значение \pm стандартное отклонение для 15 сенсоров. Все значения приведены в процентах от значения сигнала при концентрации глюкозы 5,5 ммоль/л.

23.4.3. Зависимость отклика сенсора от концентрации глюкозы

Величина и скорость изменения выходного сигнала сенсора при изменении концентрации глюкозы измеряли, промывая камеру 0–27 ммоль/л растворами глюкозы при 37 °С. Сенсор достаточно хорошо реагировал на изменения концентрации глюкозы. Время нарастания сигнала до 90%-ного уровня, характеризующее скорость отклика сенсора, составляло $16,2 \pm 6,2$ с. В указанном диапазоне концентраций отклик сенсора был линейным.

23.4.4. Влияние температуры и давления кислорода

При изменении температуры раствора от 33 до 42 °С температурный коэффициент отклика сенсора составлял $2,3 \pm 1,0\%$ град. Зависимость тока от парциального давления кислорода проверяли, используя газовые смеси кислород–азот переменного состава. Парциальное давление кислорода (15–150 мм рт. ст.) контролировали с помощью кислородного датчика. Выходной ток глюкозного сенсора в 5,5 ммоль/л растворе глюкозы увеличивался всего на 0,1% при изменении давления на 1 мм рт. ст.

23.4.5. Срок службы сенсора

Срок службы глюкозного сенсора определяли при 37 °С в камере с непрерывной циркуляцией раствора, содержащего 5,5 ммоль/л глюкозы. Каждый сенсор выдерживали до установления равновесия в этом растворе в течение 2 ч, а выходные токи непрерывно регистрировали без градуировки в течение 7 дней. При непрерывном мониторинге *in vitro* выходной ток постепенно уменьшался до $76,2 \pm 6,9$ от его первоначального значения.

23.5. Характеристики глюкозного сенсора *in vivo*

23.5.1. Методика определения характеристик сенсора *in vivo*

При мониторинге *in vivo* игольчатый глюкозный сенсор соединяют с усилителем тока типа преобразователя ток/напряжение, собранным на основе выполненного в виде микросхемы операционного усилителя (ICV 7613, Intersil Inc. США). Поляризирующее напряжение подается на глюкозный сенсор от встроенной в прибор литиевой батареи.

Для регистрации выходных сигналов сенсора к усилителю подключают перьевой самописец.

Каждый сенсор градуируют при 37°C при помощи стандартного раствора глюкозы, который готовят, растворяя 11 ммоль глюкозы в 100 мл стерилизованного 0,9%-ного раствора NaCl. Затем с помощью иглы (18-го калибра) глюкозный сенсор вводят в яремную вену или подкожную ткань здоровых и больных диабетом собак либо в подкожную ткань предплечья добровольцев (также здоровых и больных диабетом). Сигналы сенсора сравнивают с концентрациями глюкозы, которые одновременно измеряют с помощью искусственной поджелудочной железы, выполненной в виде стационарной системы прикроватного типа [11, 16].

23.5.2. Шумы при измерениях *in vivo*

При измерениях *in vivo* сенсором, введенным в подкожную ткань собак, находящихся под общим наркозом и без анестезии, шум составлял соответственно $1,3 \pm 0,5$ ($n = 5$) и $3,1 \pm 0,8$ ($n = 5$). Интенсивная мышечная работа у собак вызывает шум в диапазоне до 13,4% от уровня выходного сигнала.

23.5.3. Отклик сенсора на уровень глюкозы в крови

Содержание глюкозы в крови (y), определяемое с помощью сенсора, введенного в яремную вену собаки, сопоставляли с результатами (x), полученными на стационарной системе искусственной поджелудочной железы. В этом случае $y = 0,98x + 2$, $r = 0,998$, $n = 92$. Тесная корреляция имеется и между теми же величинами x и концентрациями глюкозы (y), измеряемыми игольчатыми сенсорами в подкожной ткани: $y = 0,85x + 3$, $r = 0,956$, $n = 144$. Как видно из рис. 23.2, хорошая корреляция между измеряемыми игольчатым сенсором в подкожной ткани величинами и истинным содержанием глюкозы в крови (x) наблюдается и у добровольцев.

23.5.4. Отклик сенсора на изменение содержания глюкозы в крови

Чтобы проверить отклик сенсора на изменение концентрации глюкозы в крови, одновременно контролировали концентрацию глюкозы в подкожной ткани и в плазме крови здоровых добровольцев, которым в течение 30 мин вводили внутривенно глюкозу в количестве $0,55 \text{ ммоль} \cdot \text{кг}^{-1} \text{ мин}^{-1}$. Рост концентрации глюкозы в подкожной ткани запаздывает на 5–10 мин по сравнению с концентрацией в плазме. Соответственно и пиковое значение концентрации глюкозы в подкожной ткани достигается на 5 мин позже (рис. 23.3).

23.5.5. Влияние давления кислорода при измерениях *in vivo*.

Для контроля фонового давления кислорода в подкожной ткани здоровых собак в ряде опытов на расстоянии 2–3 см от глюкозного сенсора дополнительно вводили контрольный кислородный электрод. После регистрации базовой линии в течение более 30 мин собакам давали вдохнуть 100%-ный азот или смесь 95% кислорода и 5% диоксида углерода. Контрольный кислородный электрод показывал флуктуации давления кислорода в подкожной ткани в диапазоне 26–50 мм рт. ст. Однако выходной сигнал глюкозного сенсора оставался постоянным независимо от изменений давления кислорода и совпадал с определяемыми независимо концентрациями глюкозы в крови (рис. 23.4).

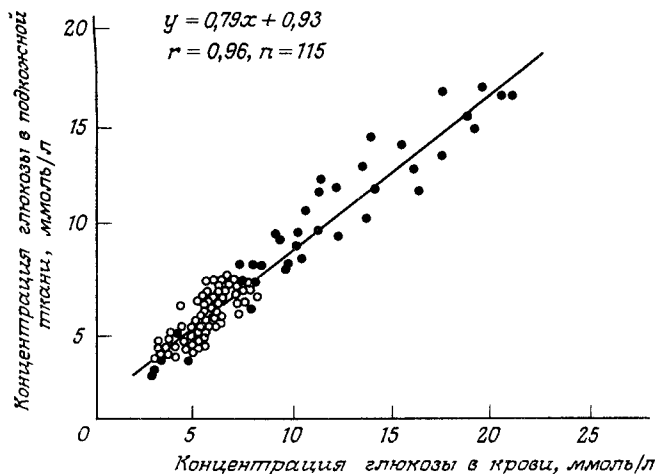


Рис. 23.2. Связь между концентрацией глюкозы, определяемой игольчатым глюкозным сенсором в подкожной ткани, и концентрацией глюкозы в крови, определяемой с помощью прикроватного аппарата искусственной поджелудочной железы. Опыты проводили на добровольцах, здоровых (○) и больных диабетом (●).

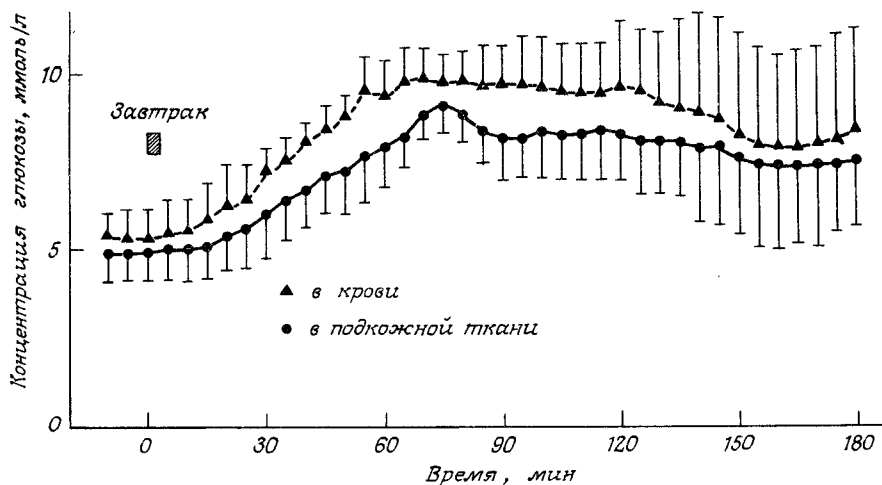


Рис. 23.3. Концентрации глюкозы в подкожной ткани (●) и в крови (▲) у больных диабетом после приема пищи, определяемые при помощи глюкозного сенсора игольчатого типа (●) и прикроватного аппарата искусственной поджелудочной железы (▲). Приведены средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 5$).

23.5.6. Срок службы сенсора в условиях *in vivo*

У сенсора, имплантированного в подкожную ткань, нельзя определить изменения его *in vitro* характеристик. Поэтому для оценки изменений характеристик сенсора *in vivo*, а также возможной реакции ткани на имплантацию сенсора целесообразно ввести специальные характеристики: «относительный» выходной ток и «относительное» время отклика сенсора. «Относительный» выходной ток рассчитывается как отношение выходного сигнала сенсора, находящегося в подкожной ткани в течение 3-х дней, к определяемой одновременно концентрации глюкозы в крови. «Относительное» время отклика сенсора определяется как время запаздывания между возрастанием уровня глюкозы в крови и соответствующим возрастанием сигнала сенсора после приема

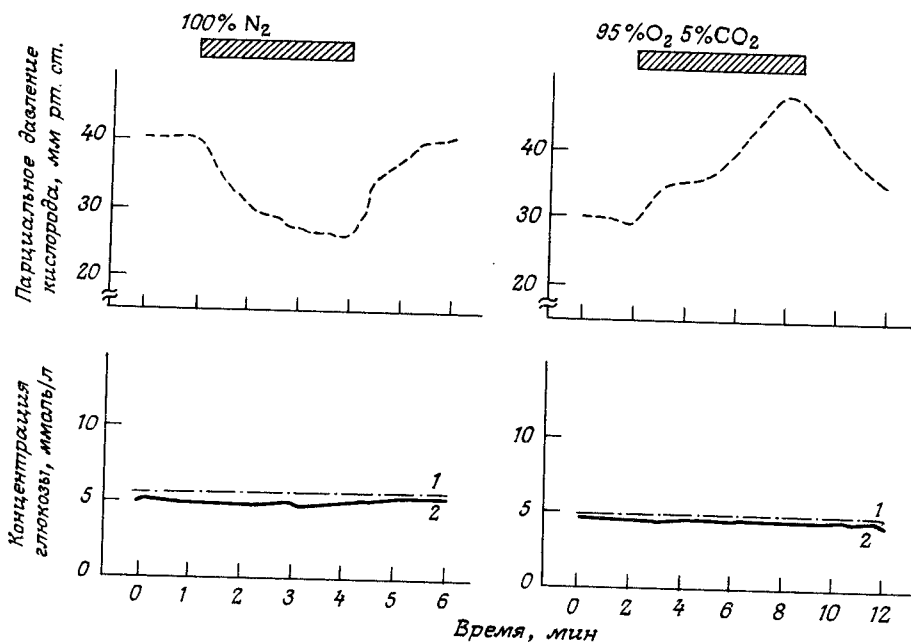


Рис. 23.4. Внизу: концентрации глюкозы в подкожной ткани собаки (2), определяемые с помощью игольчатого глюкозного сенсора, и концентрации глюкозы в периодически отбираемых пробах плазмы крови (1). Вверху: измеряемое игольчатым кислородным датчиком парциальное давление кислорода в ткани собаки при вдыхании 100% N_2 (слева) и смеси 95% O_2 и 5% CO_2 (справа).

пищи. За три дня «относительный» сигнал уменьшился до 73,5% от первоначального уровня, а «относительное» время отклика возросло с 5,1 до 13,5 мин. В то же время при определении характеристик того же сенсора *in vitro* после его удаления из ткани обнаружили уменьшение выходного сигнала всего на 23%, а время отклика увеличилось лишь на 14 с (табл. 23.3). Таким образом, ухудшение работоспособности

Таблица 23.3. «Относительный» выходной ток и «относительное» время отклика сенсоров, введенных в подкожную ткань, при длительном мониторинге

Параметр	Исходное значение*	После трехдневного использования
Характеристики <i>in vitro</i>		
Остаточный ток, нА	$1,0 \pm 0,4$	$1,4 \pm 1,2$
Выходной сигнал при концентрации глюкозы 5,5 ммоль/л, нА	$2,2 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,1$
$T_{90\%}$, с	29 ± 6	43 ± 6
Характеристики <i>in vivo</i>		
«Относительный» выходной ток, %	100	74 ± 3
«Относительное» время отклика, мин	$5,1 \pm 2,2$	$13,5 \pm 1,5$

* Для характеристик *in vitro* — перед использованием; *in vivo* — сразу после введения.

Примечания: все результаты представляют собой средние значения \pm стандартное отклонение ($n = 5$). Для опытов *in vivo* использовали другую партию сенсоров, чем в опытах *in vitro* (табл. 23.2).

имплантированного сенсора нельзя полностью объяснить ухудшением его собственных *in vitro* характеристик. Отчасти это может объясняться уменьшением скорости перфузионного потока межклеточной жидкости при имплантации сенсора.

23.5.7. Изучение поверхности сенсора с помощью сканирующего электронного микроскопа

Методом сканирующей электронной микроскопии исследовали поверхности глюкозных сенсоров, находившихся в подкожной ткани здоровых собак в течение 3, 7 и 14 дней. На рис. 23.5 приведен пример электронно-микроскопического исследования мембраны сенсора. После непрерывного трехдневного пребывания в подкожной ткани на поверхности мембраны наблюдаются следы фиксации белка и небольшие ямки. Через семь и 14 дней мембрана понемногу покрывается белком, но ямки на поверхности больше не видны. Однако во всех случаях не обнаружено фиксации на поверхности фибробластов или гигантских клеток.

Было проведено гистологическое исследование подкожной ткани здоровых собак в области введения сенсора. После трехдневного присутствия сенсора в этой области выявлена миграция лейкоцитов и слабое осаждение фибрина.

23.6. Мониторинг глюкозы *in vivo*

23.6.1. Телеметрическая система мониторинга глюкозы

Характеристики игольчатого глюкозного сенсора *in vivo* (почти линейная зависимость выходного сигнала сенсора от концентрации глюкозы в крови, быстрый отклик

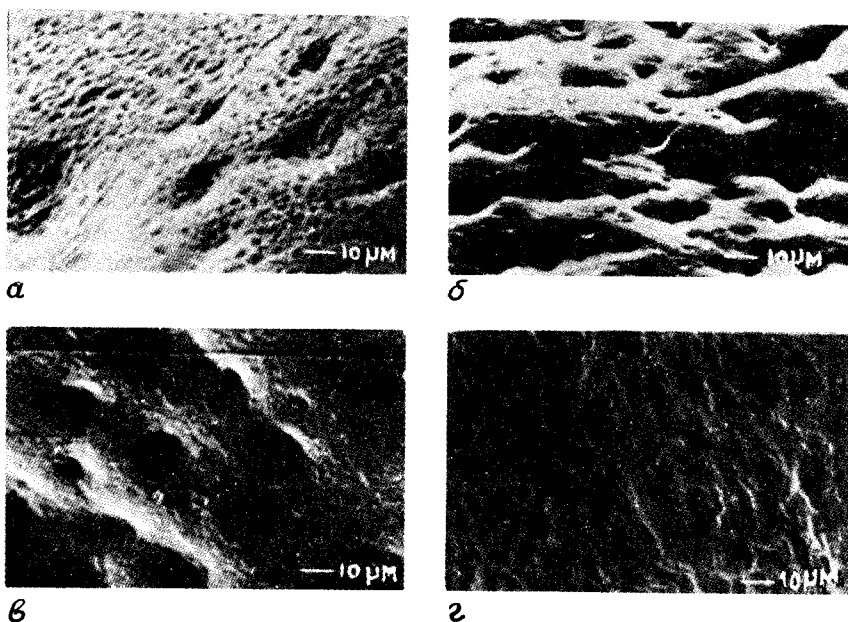


Рис. 23.5. Исследование с помощью сканирующего электронного микроскопа глюкозных сенсоров, имплантированных в подкожную ткань здоровой собаки на 3 (б), 7 (в) и 14 дней (г), и до имплантации (а).

на изменение гликемии, стабильность выходного сигнала в течение долгого времени) вполне позволяют применять его для контроля глюкозы *in vivo*. С этой целью на основе такого сенсора была разработана специальная телеметрическая система мониторинга глюкозы.

Система включает глюкозный сенсор с передатчиком и приемник. Передатчик преобразует генерируемый сенсором токовый сигнал в высокочастотный (ВЧ) звуковой сигнал. Передатчик вместе с усилителем тока типа преобразователя ток/напряжение (ICU 7613, Intersil, Inc., США), преобразователем напряжения в частоту и литиевой батареей упакован в небольшую коробочку размером $4 \times 6 \times 2$ см и общим весом 50 г. Приемник демодулирует принимаемый звуковой сигнал в напряжение, и рассчитываемая по величине напряжения концентрация глюкозы непрерывно выводится на дисплей. При гипергликемии или гипогликемии ток, выходя за предварительно установленные пределы, включает сигнал тревоги. Это устройство состоит из генератора звуковой частоты и батареек и имеет габариты $10 \times 12 \times 5$ см. Приемник может детектировать сигналы сенсора на расстоянии до 20 м.

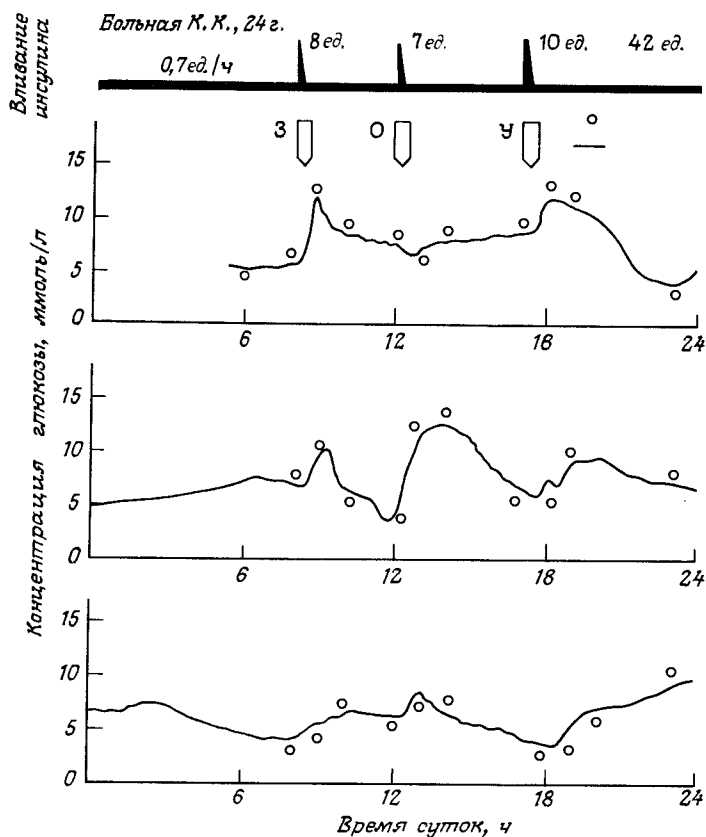


Рис.23.6. Полученные с помощью телеметрической системы данные трехдневного мониторинга гликемии у больной инсулин-зависимым диабетом при непрерывном подкожном введении инсулина. З – завтрак; О – обед; У – ужин. Звездочками отмечены значения концентрации глюкозы в крови, определенные в отобранных пробах. Приведен также график подкожного вливания инсулина с помощью системы с незамкнутым контуром.

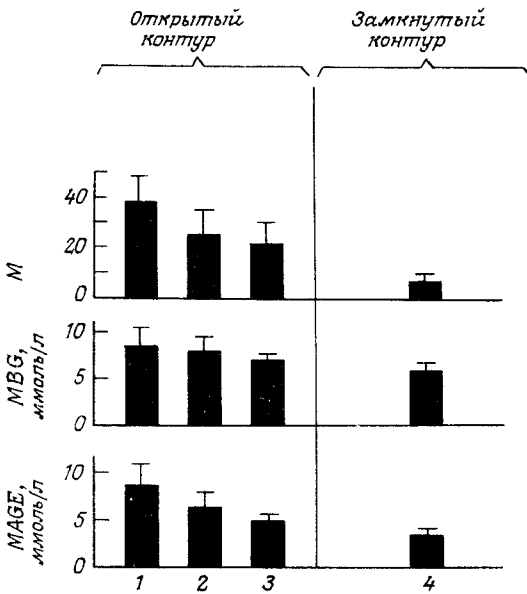


Рис. 23.7. Индексы регуляции глюкозы в крови для пациентов с инсулин-зависимым диабетом при инсулиновой терапии путем ежедневной однократной инъекции (1), многократных инъекций (2), непрерывного подкожного введения (3) и посредством носимой искусственной поджелудочной железы (4). В каждую группу входило по пять пациентов.

23.6.2. Процедура телеметрического контроля глюкозы *in vivo*.

После градуировки с помощью стерилизованных солевых растворов, не содержащих и содержащих 5,5 ммоль/л глюкозы, сенсор вводят в подкожную ткань предплечья больных диабетом с помощью иглы (18-го калибра), носимой постоянно вместе с сенсором, и фиксируют *in situ* лейкопластырем. У некоторых пациентов сенсор заменяют на новый через каждые три дня. Передатчик закрепляют на предплечье или пристегивают к поясному ремню.

23.6.3. Непрерывный мониторинг глюкозы *in vivo*

На рис. 23.6 приведен типичный пример постоянно регистрируемого в течение трех дней сигнала у больного инсулин-зависимым диабетом, подвергающегося лечению непрерывным подкожным вливанием инсулина. Постоянный мониторинг концентрации глюкозы фиксирует колебания гликемии у больного день за днем. Определяемая при помощи сенсора концентрация глюкозы в подкожной ткани совпадает с концентрацией глюкозы в плазме крови. На рис. 23.7 показаны результаты ежедневного контроля отклонения гликемии от нормы, полученные с помощью телеметрической системы на больных диабетом с различным инсулиновым режимом.

23.7. Применение системы контроля гликемии с замкнутым контуром

23.7.1. Носимая искусственная поджелудочная железа

Характеристики глюкозного сенсора игольчатого типа вполне позволяют применять его в контрольной системе с замкнутым контуром, причем в варианте для ношения пациентом. Авторы разработали носимую искусственную поджелудочную железу, которая состоит из игольчатого глюкозного сенсора, микрокомпьютерной

системы, двух шприцевых систем для вливания инсулина и глюкагона и литиевых батареек. Вся система упакована в единый блок ($12 \times 15 \times 6$ см) весом 400 г.

23.7.2. Алгоритм управления замкнутой системой вливания инсулина и глюкагона

Алгоритм внутривенного вливания инсулина и глюкагона для носимой системы тот же, что и в случае стационарной прикроватной системы [11, 16]. Скорость вливания инсулина $PIR(t)$, ед. активности $\cdot 10^{-3} \text{ кг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, выражается следующим образом:

$$PIR(t) = K_p BG(t) + K_d \cdot \Delta BG(t) + K_c, \quad (23.1)$$

где $BG(t)$ и $\Delta BG(t)$ — соответственно концентрация глюкозы в крови, ммоль/л, и скорость ее изменения, ммоль $\cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, в момент времени t ; K_p и K_d — соответствующие коэффициенты пропорциональности; K_c — постоянная, характеризующая базовую скорость подачи инсулина. Показано, что при правильном подборе параметров ($K_p = 0,51$; $K_d = 4,89$ и $K_c = -2,02$) этот алгоритм обеспечивает полный гликемический контроль при физиологической инсулинемии.

Скорость вливания глюкагона $GIR(t)$, $\text{нг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, описывается выражением

$$GIR(t) = G_p \cdot (BG_p - BG(t - \tau)) + G_d \cdot (-\Delta BG(t - \tau)) + G_c, \quad (23.2)$$

где BG_p — предварительно задаваемая концентрация глюкозы в крови (обычно 4,4 ммоль/л); τ — время запаздывания начала ввода глюкагона; G_p и G_d — соответствующие коэффициенты пропорциональности; G_c — постоянная, характеризующая базовую скорость подачи глюкагона.

23.7.3. Подавление шума

Ток, генерируемый глюкозным сенсором, так мал, что выходной сигнал может искажаться шумом. Поэтому систему снабжают встроенным фильтром, а в компьютер вводят дополнительную программу очистки сигнала от шума. Поскольку сигнал сенсора представляет собой постоянный ток, в качестве встроенного фильтра вполне эффективна система фильтров, пропускающая низкие и высокие частоты. Что касается программного шумового фильтра, компьютер рассчитывает среднее из значений выходного тока сенсора для десяти проб, измеряемых через каждые 10 мкс; полученная таким образом новая точка отбрасывается, если отклонение ее от значения для предыдущей минуты превышает предварительно установленный предел.

23.7.4. Методика гликемического контроля в системе с замкнутым контуром с помощью носимой искусственной поджелудочной железы

Была предпринята попытка гликемического контроля пациентов с инсулин-зависимым диабетом при помощи переносимой искусственной поджелудочной железы. В алгоритмах вливания инсулина и глюкагона использовали следующие значения параметров: $K_p = 0,51$; $K_d = 4,89$; $K_c = -2,02$; $G_p = 3,6$; $G_d = 7,2$; $G_c = 0,4$ и $\tau = 10$. Сенсор заменяли новым через каждые три дня. У всех пациентов данные контроля гликемии сравнивали с результатами, полученными в интенсивном режиме многократных инъекций инсулина и режиме непрерывного подкожного введения инсулина.

23.7.5. Замкнутая система контроля гликемии у больных диабетом

На рис. 23.8 изображены типичные графики шестидневного контроля гликемии у больного инсулин-зависимым диабетом. У всех исследованных пациентов достигалась регуляция гликемии на физиологическом уровне. Как показано на рис. 23.7, у пациентов с носимой искусственной поджелудочной железой такие индексы ежедневного отклонения гликемии от нормы, как MBG (средняя концентрация глюкозы), M (показатель контроля сахара в крови больных диабетом) [14] и MAGE (среднее отклонение гликемии от нормы), существенно улучшаются по сравнению с пациентами, подвергаемыми обычной инсулиновой терапии, интенсивной терапии с многократным введением инсулина и непрерывному введению инсулина под кожу.

23.8. Заключение

Успешный гликемический контроль больных диабетом с помощью искусственной поджелудочной железы [1, 11, 13] подчеркивает важность непрерывного мониторинга гликемии для установления строгого контроля. Основная трудность в распространении гликемического контроля на больных диабетом заключается в разработке имплантируемого глюкозного сенсора, позволяющего определять глюкозу в тканях с высокой точностью.

Глюкозный электрод игольчатого типа, представляющий собой миниатюрный датчик пероксида водорода, покрытый мембраной с биологически активным компонентом, можно без труда имплантировать и удалить. Характеристики сенсора *in vitro* и *in vivo* позволяют применять его для непрерывного мониторинга глюкозы в ткани.

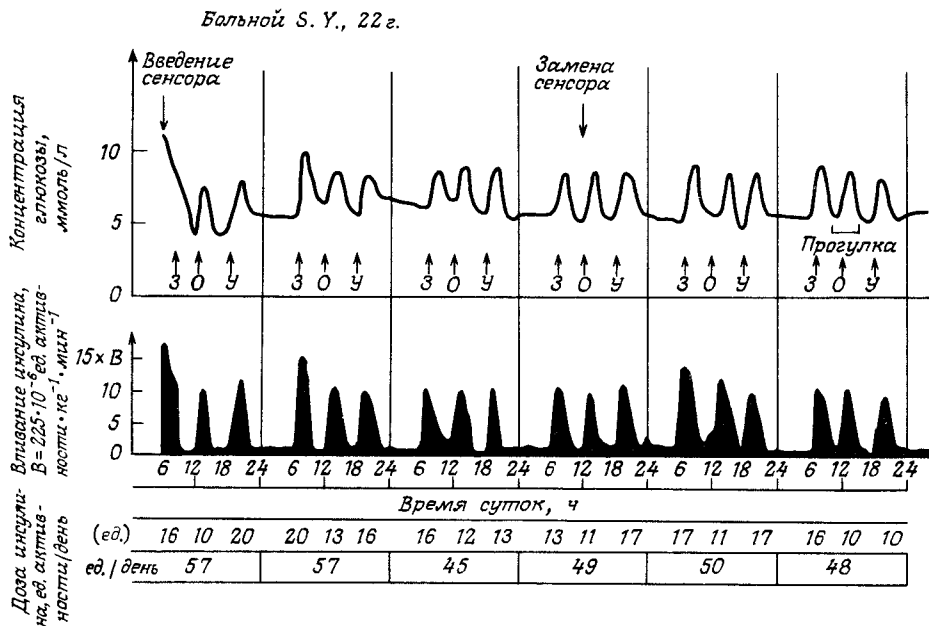


Рис. 23.8. Непрерывный шестидневный контроль гликемии у пациента с инсулин-зависимым диабетом с помощью носимой искусственной поджелудочной железы. Сенсор был заменен на 4-й день. Показаны также графики вливания инсулина и доз накопленного инсулина. Обозначения: 3 – завтрак; О – обед; У – ужин.

Телеметрическая система на основе игольчатого глюкозного сенсора вполне пригодна для слежения за концентрацией глюкозы у амбулаторных больных. Кроме того, для поддержания гликемии у больных диабетом на уровне, близком к физиологическому, в течение более шести дней разработана переносная искусственная поджелудочная железа, включающая игольчатый глюкозный сенсор.

Дальнейшее совершенствование конструкции сенсора, особенно улучшение биологической совместимости его мембраны, может снизить реакцию ткани на имплантированный сенсор и тем самым продлить срок его службы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Albisser A. M., Leibel B. S., Ewart T. G., Davidovac Z., Botz C. K., Zingg W., Schipper H., Gander R.* Clinical control of diabetes by the artificial pancreas. *Diabetes*, **23**, 397–400 (1974).
2. *Bartlett D., Jr., Tenney S. M.* Tissue gas tensions in experimental anemia. *J. Appl. Physiol.*, **18**, 734–8 (1963).
3. *Bessman S. P., Thomas L. J., Kojima H., Sayler D. F., Layne E. C.* The implantation of a closed-loop artificial beta cell in dogs. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **27**, 7–18 (1981).
4. *Chang K. W., Aisenberg S., Soeldner J. S.* *In vitro* tests of an implantable glucose sensor. *Proc. of 25th Ann. Conf. on Eng. in Med. and Biol.*, p. 58 (1972).
5. *Gibson Q. H., Swoboda B. E. P., Massey V.* Kinetics and mechanism of action of glucose oxidase. *J. Biol. Chem.* **239**, 3927–34 (1964).
6. *Gough D. A., Anderson F. L., Giner J., Colton C. K., Soeldner J. S.* Effect of coreactants on electrochemical glucose oxidation. *Anal. Chem.*, **50**, 941–4 (1981).
7. *Guilbault G. G., Lubrano A.* An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose. *Anal. Chim. Acta*, **64**, 439–55 (1973).
8. *Haqihara B., Ishibashi F., Sato N., Minami T., Okada Y., Sugimoto T.* Intravascular oxygen monitoring with a polarographic oxygen cathode. *J. Biomed. Eng.* **3**, 9–16 (1981).
9. *Ikeda S., Aoyama N., Ito K., Ohkura K., Yamamoto T., Ichihashi H., Kondo T.* Artificial pancreas—study of the new vessel access type glucose sensor. *Jpn. J. Artif. Organ*, **9**, 182–92 (1980).
10. *Kawamori R., Shichiri M., Goriya Y., Yamasaki Y., Shigeta Y., Abe H.* Importance of insulin secretion based on the rate of change in blood glucose concentration in glucose tolerance, assessed by the artificial beta cell. *Acta Endocrinol.*, **87**, 339–51 (1978).
11. *Kawamori R., Shichiri M., Kikuchi M., Yamasaki Y., Abe H.* Perfect normalization of excessive glucagon responses to intravenous arginine in human diabetes mellitus with the artificial beta cell. *Diabetes*, **29**, 762–5 (1980).
12. *Layne E. C., Schultz R. D., Thomas L. J., Slama G., Sayler D. F., Bessman S. P.* Continuous extracorporeal monitoring of animal blood using the glucose electrode. *Diabetes*, **25**, 81–9 (1976).
13. *Pfeiffer E. F., Thum Ch., Clemens A. H.* The artificial beta-cell—a continuous control of blood sugar by external regulation of insulin infusion (glucose controlled insulin infusion system). *Horm. Metab. Res.*, **6**, 339–42 (1974).
14. *Schlichtkrull J., Munk O., Jersild M.* The M-value, an index of blood-sugar control in diabetes. *Acta Med. Scand.*, **177**, 95–102 (1965).
15. *Service F. J., Molnar G. D., Rosevear J. W., Ackerman E., Gatewood L. C., Taylor W. F.* Mean amplitude of glycemic excursions, a measure of diabetic instability. *Diabetes*, **19**, 644–755 (1970).
16. *Shichiri M., Kawamori R., Abe H.* Normalization of paradoxical secretion of glucagon in diabetics who were controlled by the artificial beta cell. *Diabetes*, **28**, 272–5 (1979).
17. *Shichiri M., et al.* Closed-loop glycemic control with a wearable artificial endocrine pancreas—Validations in daily insulin requirements to glycemic response. *Diabetes*, **33**, 1200–2 (1984).
18. *Shichiri M., Yamasaki Y., Hakui N., Abe H.* Wearable-type artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor. *Lancet*, **2**, 1129–31 (1982).
19. *Shichiri M., Goriya Y., Yamasaki Y., et al.* Glycaemic control in pancreatectomized dogs with a wearable artificial endocrine pancreas. *Diabetologia*, **24**, 179–84 (1983).
20. *Soeldner J. S., Chang K. W., Aisenberg S., Hiebert J. M., Egdahl R. H.* Diabetes mellitus a bioengineering approach—An implantable glucose sensor. In *Diabetes mellitus*. *Forgarty International Center Series on Preventive Medicine* (ed. S. S. Fajan), Vol. 4, pp. 267–77. Dept. of Health, Education and Welfare Public Health Service, National Institutes of Health, 1976.
21. *Updike S. J., Hicks G. P.* The enzyme electrode, a miniature chemical transducer using immobilized enzyme activity. *Nature*, **214**, 986–8 (1967).
22. *Woodward S. C.* How fibroblasts and giant cells encapsulate implants: Considerations in design of glucose sensors. *Diabetes Care*, **5**, 278–81 (1982).
23. *Yamasaki Y.* The development of a needle-type glucose sensor for wearable artificial endocrine pancreas. *Med. J. Osaka Univ.*, **35**, 25–34 (1984).

В. Изучение электрического импеданса

Глава 24

Принципы и возможности спектроскопии электрического адмиттанса

Дуглас Б. Келл

24.1 Введение

Во многих электрохимических методах на рабочий электрод налагают постоянное (фиксированное) напряжение и измеряют возникающий при этом ток в цепи между рабочим и вспомогательным электродом [14, 27, 134]. Даже в методе импульсной вольтамперометрии измерительную систему конструируют таким образом, чтобы разность потенциалов между рабочим электродом и электродом сравнения, а также измеряемый в конечном итоге ток были постоянными на протяжении большего или меньшего периода времени. В последние два десятилетия возрастает интерес к использованию *синусоидальных* напряжений для исследования электродных процессов в водных растворах [5, 14, 27, 32, 39, 80, 83, 136, 137, 185, 198, 199]. Данный подход обладает двумя преимуществами, в частности: 1) наряду с высоким значением отношения сигнал/шум, предсказанным на основе анализа «стационарного состояния», он позволяет использовать обычную технику и разработанный математический аппарат гармонического анализа [57, 63, 81, 146]; 2) можно менять не только напряжение, но и частоту возбуждающего сигнала, что позволяет рассматривать или применять этот метод как одну из форм спектроскопии.

Чтобы выразить вышесказанное иначе, обратимся к знакомой всем идее использования зависящего от частоты поглощения ультрафиолетового, видимого и инфракрасного света для анализа биологических (и других) материалов. Поскольку свет — это только форма электромагнитного излучения, хотя и довольно высокой частоты (порядка 10^{14} Гц), вполне допустимо предположить, что и аналогичное поглощение электрической энергии *более низких* частот можно использовать в биоаналитических приборах. При таких частотах, по крайней мере ниже примерно 30 МГц, электрод должен выступать как посредник между возбуждающим электрическим полем и исследуемым образцом. Тогда, как и в упомянутых выше «чисто» электрохимических методах, можно изучать частотно-зависимые, пассивные электрические свойства системы, состоящей из электродов и биологического материала; иными словами, можно изучать импеданс или адмиттанс системы.

Исходя из сказанного выше, в дальнейшем предполагается: 1) дать самое элементарное представление об электрическом импедансе и адмиттансе; 2) обсудить применение этих принципов для измерений в электроанализе (преимущественно в нефарадеевском); 3) ввести родственную концепцию диэлектрической спектроскопии биологических веществ. Рассмотрев эти вопросы, можно 4) перейти к обсуждению использования переменноточковых методов, включая частотный анализ сигналов (ЧАС), в биосенсорных приложениях *sensu lato*. Ввиду относительной важности обсуждаемой проблемы и ограниченного объема книги мы не пытались сделать данный обзор исчерпывающим. Наша цель прежде всего в том, чтобы предложить широкому

читателю введение в область, которая, как полагает автор, недооценивается биологами и биофизиками (несмотря на ее многие эффективные достижения) и которая все же является основой для большого числа сегодняшних и будущих биосенсорных приложений.

24.2 Электрический импеданс и адмиттанс

Рассмотрим синусоидально модулируемое напряжение, описываемое выражением $V = V_m \sin \omega t$, где ω – частота, $\text{рад} \cdot \text{с}^{-1}$ ($\omega = 2\pi f$, где f – частота, Гц); V_m – максимальное (пиковое) напряжение; V – напряжение в любой данный момент времени. Если это напряжение приложено к концам пассивной цепи прибора или «системы» (которая может состоять из чисто электрических компонентов или включать также биологические или химические компоненты, разделяющие пару электродов), то проходящий в цепи ток (после завершения всех переходных процессов) связан с напряжением как по величине, так и по фазе: $i = i_m \sin(\omega t + \theta)$. Таким образом (рис 24.1,а), хотя частота и синусоидальная форма сигнала не меняются при взаимодействии с системой, свойства последней отражаются в отношении V_m/i_m и величине θ .

Системы могут проявлять омические, емкостные и индуктивные свойства, которые (по определению) отличаются друг от друга влиянием на синусоидальный сигнал. Так,

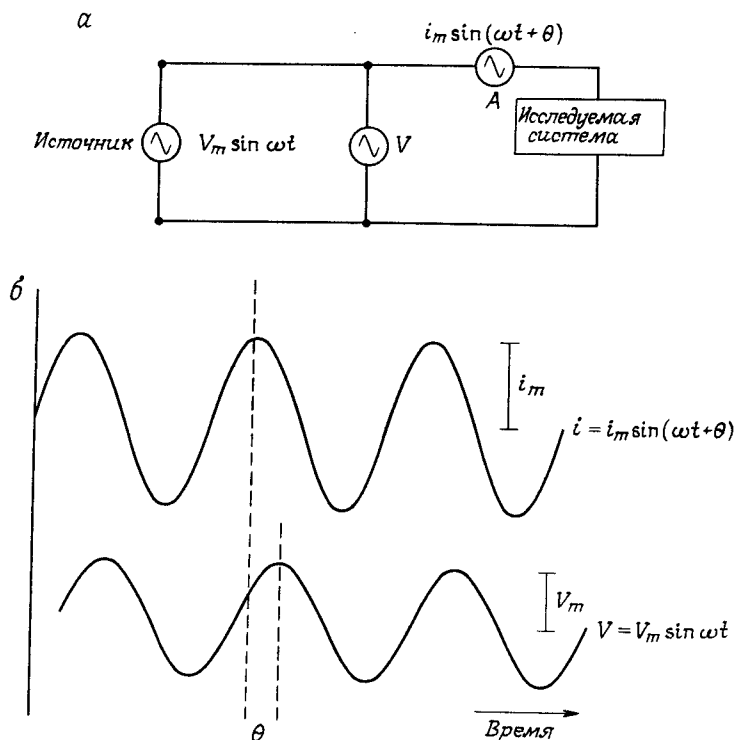


Рис. 24.1. Схема импедансометрического эксперимента, в котором к исследуемой системе прилагается возмущение малой амплитуды в виде синусоидального напряжения. Синусоидальное напряжение в системе измеряют с помощью переменного-токового вольтметра V , а синусоидальный ток, протекающий в цепи, – с помощью векторного амперметра A . Фаза тока отличается от фазы напряжения на угол θ ; в приведенном случае ток опережает напряжение.

в случае чистого омического сопротивления (R , Ом), ток, обуславливаемый синусоидальным напряжением ($V_m \sin \omega t$), описывается выражением

$$i = (V_m/R) \sin \omega t. \quad (24.1)$$

Для «чистой» емкости (C , Ф)

$$i = \omega C V_m \sin (\omega t + \pi/2), \quad (24.2)$$

тогда как для чистой (само-) индуктивности (L , Гн)

$$i = (V_m/\omega L) \sin (\omega t - \pi/2). \quad (24.3)$$

Таким образом, для чистого сопротивления величины V и i совпадают по фазе. В то же время для емкости ток опережает напряжение на $\pi/2$ рад (90°), а для индуктивности — отстает от напряжения на ту же величину. За исключением активных биологических систем, таких как аксоны нервных клеток (см., например, [54, 61, 110]) и некоторых электрохимических систем, особенно тех, где наблюдается коррозия и электроосаждение [80, 83, 137], индуктивность, как правило, незначительна, поэтому в дальнейшем мы будем ею большей частью пренебрегать. Следовательно, интуитивно можно представить себе (и это оказывается верно), что для реальной системы, обладающей как омическими, так и емкостными свойствами (т.е. ведущей себя как конденсатор с утечкой), θ принимает значения между 0 и $\pi/2$, как показано на рис. 24.1,б.

Далее мы можем определить *импеданс* как векторную величину Z с модулем $|Z|$ и аргументом («направлением») θ , где $|Z|$ равен отношению V_m/i_m (рис. 24.2). Этот вектор можно представить в виде комплексного числа типа $a + ib$ (где $i = \sqrt{-1}$). Тогда импеданс состоит из двух частей, реальной и мнимой, и определяется выражением $Z = R + iX$, где реактивное сопротивление $X = -1/\omega C$. В этом представлении систему рассматривают как состоящую из *последовательно* соединенных сопротивлений и емкости.

Мы можем также рассматривать систему как состоящую из *параллельно* соединенных проводника с эквивалентной проводимостью $G(\text{См}) = 1/R'$ и емкости C' . В этом случае целесообразно ввести понятие *адмиттанса* как вектора Y с модулем $|Y| = i_m/V_m = 1/|Z|$ и аргументом θ , причем $Y = 1/Z = G + iB$, где $B = \omega C'$ — реактивная проводимость.

Кратко различие между этими двумя подходами можно сформулировать следующим образом [69]. Представление об импедансе используют тогда, когда хотят описать влияние напряжения на ток. При этом предполагают, что клеммы исследуемой системы (в конфигурации, изображенной на рис. 24.1,а) соединены с источником тока

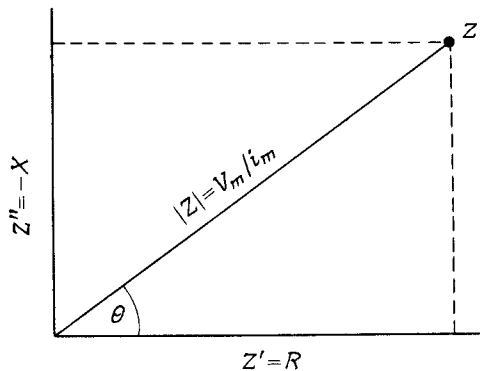


Рис. 24.2. Импеданс как комплексная величина. Существует математическая функция, называемая тождеством Эйлера, согласно которой $Ae^{\pm i\theta} = A \cos \theta + Ai \sin \theta$, где $i = \sqrt{-1}$. Таким образом, в любой комплексной величине можно выделить реальную и мнимую части. На рисунке показана такая процедура для импедансной функции $Z = R + iX$. Из простых геометрических соображений следует, что $Z^2 = R^2 + X^2$ и $R = |Z| \cos \theta$, $X = -|Z| \sin \theta$. Отсюда R и X можно найти, измерив значение величин $|Z|$ и θ . По смыслу R и X соответствуют компонентам сигнала «в фазе» (0°) и «не в фазе» (90°).

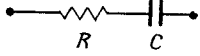
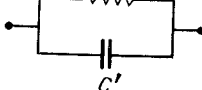
Последовательное соединение	Параллельное соединение
Импеданс	Адмиттанс
$Z = R + iX$	$Y = \frac{1}{Z} = G + i\omega C'$
$R = \frac{G}{G^2 + (\omega C')^2}$	$G = \frac{R}{R^2 + X^2}$
Активное сопротивление	Активная проводимость
$X = \frac{-\omega C'}{G^2 + (\omega C')^2} = \frac{-1}{\omega C}$	$B = \omega C' = \frac{-X}{R^2 + X^2}$
Реактивное сопротивление	Реактивная проводимость
	
	$R' = 1/G$

Рис. 24.3. Соотношение между импедансом и адмиттансом, их реальными и мнимыми составляющими. Обсуждение см. в тексте.

через бесконечное сопротивление (разомкнутая цепь). И наоборот, через понятие адмиттанса удобно выражать влияние тока на напряжение. В этом случае клеммы системы полагают подключенными к источнику напряжения через нулевое сопротивление (короткозамкнутая цепь).

Поскольку указанные различия касаются только способа *интерпретации* исследуемой системы, можно переходить из импедансной в адмиттансную область и обратно, выбирая соответствующие величины R , C , G и C' . Для удобства на рис. 24.3 приведены соответствующие уравнения. Другими словами, независимо от *фактической* сложности системы (или ее эквивалентной электрической цепи) между клеммами измерительного прибора при проведении измерений на данной частоте система рассматривается просто как состоящая из единственного сопротивления (проводимости), соединенного последовательно или параллельно с единственной емкостью. В случае реальных цепей импеданс $Z(\omega)$ или адмиттанс $Y(\omega)$ и их реальные и мнимые части являются функциями частоты, и эти зависимости можно использовать для описания эквивалентных электрических цепей. Следует отметить, что по определению импеданс и адмиттанс не зависят от приложенного напряжения и тока, текущего в исследуемой системе. «Линейный характер» этих величин необходимо учитывать при их использовании.

В общем случае наиболее удобное средство установления соотношения между значениями измеряемых величин и топологией компонентов, составляющих эквивалентную цепь, — это диаграммы на комплексной плоскости. К этому вопросу мы теперь и перейдем.

24.3 Импедансные диаграммы

При измерении зависящей от импеданса частоты электрической цепи, состоящей из сопротивления 2,671 кОм и параллельно подключенного конденсатора емкостью 220,4 пФ, получаются графики типа приведенных на рис. 24.4 (напомним, что, хотя фактически цепь является параллельной, в импедансном представлении ее рассматривают как состоящую из последовательно соединенных элементов). Таким образом

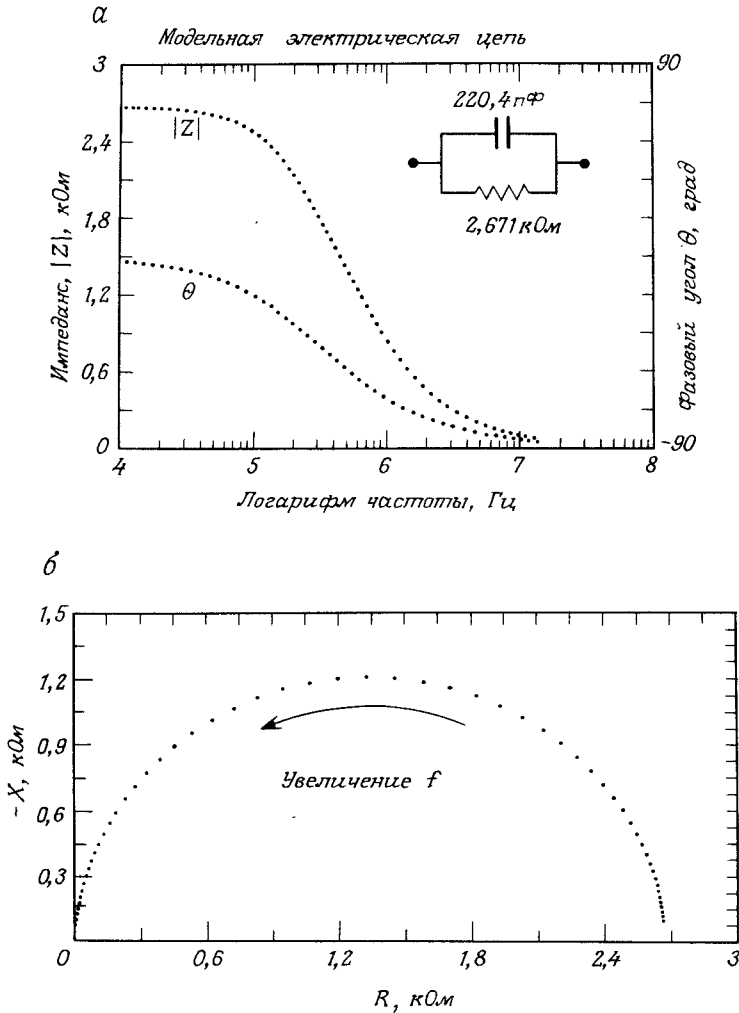


Рис. 24.4. Частотно-зависимый импеданс модельной электрической цепи. Для измерений и построения графиков использовали описанную в работе [94] импедансометрическую систему с широким диапазоном частот.

а: модуль импеданса и фазовый угол как функция частоты. Обратите внимание на два плато в областях частот соответственно ниже и выше f_c ; *б:* зависимость реактивного сопротивления от активного, показывающая, что исследуемая цепь имеет только одну постоянную времени. Более подробное обсуждение приведено в тексте.

(рис. 24,4а), по мере увеличения частоты мы наблюдаем, что, во-первых, фазовый угол (θ , как определено на рис. 24.1) уменьшается от 0 (чисто омическое сопротивление) до $\sim -90^\circ$ (чисто емкостное или реактивное сопротивление) и, во-вторых, модуль импеданса $|Z|$ уменьшается от 2,67 $\kappa\Omega$ почти до нуля. Анализируя рис. 24.4,а, можно найти частоту полуперехода, так называемую критическую, или характеристическую частоту f_c . На рис. 24.4,а она составляет приблизительно 300 $\kappa\text{Гц}$. Поскольку произведение сопротивления на емкость имеет размерность времени (секунды), это эквивалентно определению времени релаксации τ (постоянной времени) для данной цепи. Поскольку

$\tau = 1/2\pi f_c$, можно также рассчитать значение $\tau = (5,89 \cdot 10^{-7} \text{ с})$ и $f_c (270 \text{ кГц})$ просто по параметрам резистора и конденсатора в рассматриваемой цепи.

Теперь, как показано на рис. 24.2, по измеренным значениям $|Z|$ и θ можно вычислить реальную (R) и мнимую (X) части импеданса и, поскольку эти величины меняются с частотой, построить график зависимости реактивного сопротивления от активного, используя частоту как параметр. Такая зависимость приведена на рис. 24.4,б, откуда видно, что результирующий график имеет вид полуокружности с центром на оси абсцисс, а максимальное значение $-X$ достигается при характеристической частоте (ср. рис. 24.4,а и б). Если же проводить измерения в широком диапазоне частот, то становится очевидным (или по крайней мере вполне вероятным), что полуокружность будет экстраполироваться к значениям 0 и 2,67 кОм. Таким образом, как описано во многих вводных курсах по анализу электрических цепей (см., например, [23, 25, 35, 65, 99]), импедансные диаграммы отражают параметры элементов эквивалентной электрической цепи и могут использоваться для нахождения этих параметров.

При помощи уравнений, приведенных на рис. 24.3, по графику (рис. 24.4,а) можно рассчитать также величины G и B , используемые в представлении об адмиттансе. В этом случае график зависимости B от G (адмиттансная диаграмма) также будет иметь вид полуокружности с центром на оси абсцисс и максимальным значением B при возбуждающей частоте, равной f_c . Построение такого графика оставляем читателю в качестве полезного упражнения. Перейдя к рассмотрению комплексной проводимости и диэлектрической проницаемости, мы увидим также, что хотя из обоих графиков получается одна и та же информация, относительные *веса* данных в них различны, что можно использовать для усиления тех или иных частотных областей [139].

24.4. Импедансные диаграммы в электрохимических системах

По историческим и различным другим причинам в электрохимической литературе доминирует импедансный подход, хотя Макдональд и сотр. [138, 139] подчеркивают единство трехмерного графика $R - X \cdot \log f$. Основная цель при исследовании импеданса чисто электрохимических и во многих случаях твердотельных систем (в противоположность биологическим) заключается в получении информации об электродных процессах, т. е. процессах, протекающих на границе раздела электрод/электролит. Так, поскольку такие процессы явно зависят от «среднего» потенциала рабочего электрода, необходимо фиксировать известное значение этого потенциала, либо введя в среду оба компонента редокс-пары с известным E'_0 (фарадеевский импеданс), либо с помощью электронных средств. В последнем случае, в частности, принято использовать трехэлектродную систему [14, 27, 80]. При таких двух- или трехэлектродных измерениях, естественно, требуется, чтобы электроды были идентичны, либо чтобы импеданс рабочего электрода был намного больше импеданса противоэлектрода.

Интерпретация электрохимического импеданса — необъятная, детально разработанная и сложная область. Для целей данного обзора достаточно как можно более простое описание ее важнейших принципов, которые можно сформулировать следующим образом: 1) электрический двойной слой [26, 148, 149, 202] на границе раздела электрод/электролит обладает, вследствие его молекулярной толщины, значительной емкостью (обычно несколько микрофард на 1 см^2 рабочей площади электрода), которая должна быть заряжена перед протеканием любого фарадеевского тока; 2) скорость последующей реакции может лимитироваться переносом заряда, диффузией электроактивного вещества в реакционный слой или обоими этими стадиями, причем в последнем случае график зависимости $R - X$ представляет собой суперпозицию прямой и полуокружности; 3) при очень высоких частотах остаточное сопротивление соответствует сопротивлению объема раствора между электродами; 4) диффузионный импе-

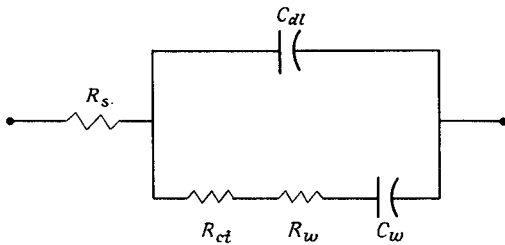


Рис. 24.5. Общий вид эквивалентной электрической схемы электрохимической ячейки. Емкость двойного слоя C_{dl} включена параллельно сопротивлению R_{ct} , представляющему «фарадеевскую» стадию переноса заряда, поскольку геометрически они находятся фактически в одном и том же месте. Эта структура последовательно соединена с импедансом Варбурга Z_w , который состоит из активного сопротивления и емкости, эквивалентных по сути «диффузионной зоне». Наконец, последовательно всей этой части схемы подключено сопротивление R_s , характеризующее « iR -потери» в объеме электролита. Фактические значения всех этих составляющих, очевидно, и определяют отклик всей системы на изменение частоты. Необычные обозначения емкостей на схеме указывают на некоторую неоднородность представляемых ими структур.

данс часто называют импедансом Варбурга Z_w и представляют в виде последовательно соединенных сопротивлений и конденсатора. Эквивалентная электрическая схема данной системы (обычно ее приписывают Рэндлсу [174]) приведена на рис. 24.5. Отметим, что здесь мы начинаем соотносить компоненты электрической цепи с механическими объяснениями свойств электрода.

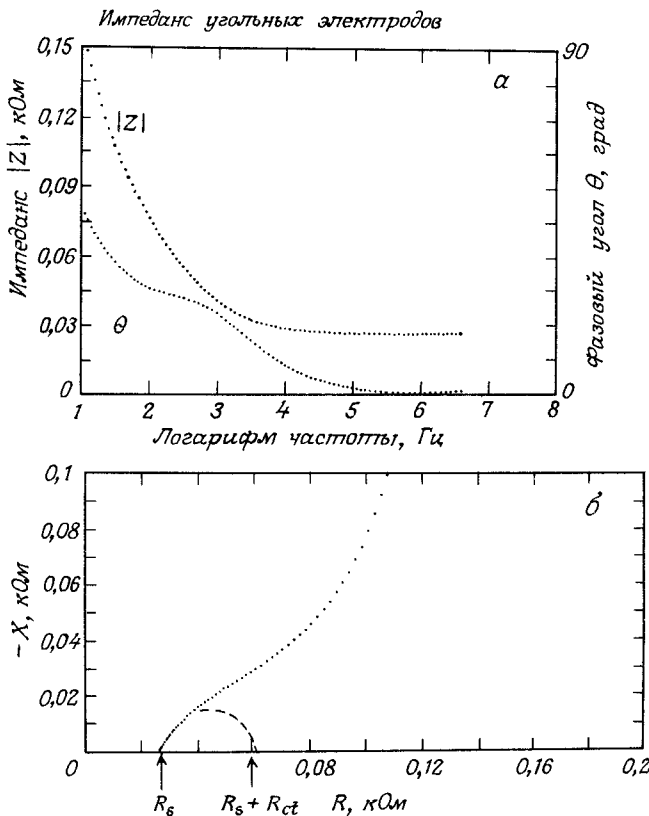
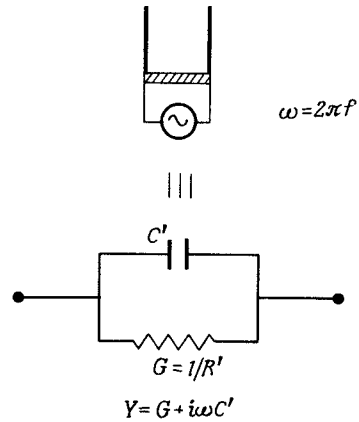


Рис. 24.6. Частотно-зависимый импеданс пары графитовых электродов, погруженных в 100 мМ раствор КСl. Измерения проводили на аппаратуре, описанной в работе [94], при модулирующем напряжении 50 мВ. а: модуль импеданса и фазовый угол как функция логарифма частоты; б: импедансная диаграмма. Показано, как определить значение R_s и R_{ct} по той части графика, которая представляет собой полуокружность [106]. В классической системе Варбурга низкочастотная (правая) часть импедансной кривой должна образовывать с осью абсцисс угол 45° . По характеристической частоте для полуокружности можно найти значение C_{dl} из соотношения $C_{dl} = 1/2\pi f_c R_{ct}$.

Рис. 24.7. При любой частоте пассивные электрические свойства системы полностью описываются адмиттансом $G + i\omega C'$ эквивалентной параллельной цепи.



Следует подчеркнуть, что на практике может наблюдаться и более сложное поведение электрохимических систем. На рис. 24.6 показана экспериментально полученная импедансная диаграмма пары цилиндрических графитовых электродов (радиус 4 мм, длина 20 мм, шероховатость поверхности неизвестна, расстояние между электродами 10 мм), погруженных в 100 мМ раствор KCl. Как видно, эта диаграмма довольно точно соответствует поведению рассмотренной выше системы (см. также [20]). Что касается этого рисунка, можно отметить следующие моменты: 1) форма полуокружности ни в коем случае не является совершенной, она плохо отделена от прямолинейного участка, и ее вряд ли можно подогнать так, чтобы центр лежал на оси абсцисс — последнее можно объяснить неоднородностью структур, определяющих C_{dl} и R_{ct} ; 2) частотная зависимость импеданса простирается в слишком широком диапазоне — в данном случае по меньшей мере на семь порядков величины частоты; 3) в этом диапазоне импеданс материала между электродами (это просто ионный раствор) не зависит от частоты, и, следовательно, наблюдаемая частотная зависимость обуславливается электрохимическими реакциями на электродах.

Очевидно, что измеряемое активное и реактивное сопротивления нашей электрохимической ячейки являются функциями размеров и геометрии электродов; одинаковые электроды большой площади, находящиеся на малых расстояниях друг от друга, обладают низким импедансом. Поскольку во многих случаях именно интенсивные свойства системы представляют интерес, целесообразно использовать представления об адмиттансе (рис. 24.7) и соответственно ввести обозначения диэлектрической проницаемости и проводимости.

24.5. Диэлектрическая проницаемость, удельная проводимость и дисперсия диэлектрической проницаемости

Пассивные электрические свойства материала, помещенного между двумя параллельными электродами с площадью A и межэлектродным расстоянием d , полностью определяются проводимостью σ' и диэлектрической проницаемостью ϵ' , которые связаны с измеряемыми проводимостью G и емкостью C' уравнениями

$$G = \sigma' (A/d), \quad (24.4)$$

$$C' = \epsilon' \epsilon_r (A/d). \quad (24.5)$$

Из уравнения (24.4) находим, что для нахождения удельной проводимости необходимо умножить проводимость на d/A . Этот множитель, имеющий размерность обратной

длины (например, см^{-1}), называют постоянной ячейки. В уравнении (24.5) величина ϵ_r (в литературе ее иногда обозначают ϵ_0) представляет собой емкость ячейки единичных размеров в вакууме и равна $8,854 \cdot 10^{-14}$ Ф/см. Таким образом, любое вещество, находящееся между электродами, будет приводить к увеличению емкости в ϵ' раз. Множитель ϵ' раньше называли диэлектрической постоянной, но (поскольку это не постоянная величина) его лучше называть диэлектрической проницаемостью. При 25°C диэлектрическая проницаемость воды составляет приблизительно 78,4. Подставляя эту величину в уравнения 24.4 и 24.5, получаем, что при 25°C заполненная водой ячейка с постоянной ячейки 1 см^{-1} имеет емкость 6,94 пФ. Ионные электролиты оказывают умеренное влияние на диэлектрическую проницаемость водных растворов. Так, при 25°C диэлектрическая проницаемость 1 М раствора NaCl составляет примерно 61,6 [59].

Для многих целей полезно использовать комплексную проницаемость $\epsilon^* = \epsilon' - i\epsilon''$, которая, как и импеданс, и адмиттанс, состоит из реальной и мнимой частей. Последняя, называемая диэлектрическими потерями, связана с проводимостью уравнением

$$\epsilon'' = \frac{\sigma' - \sigma'_L}{2\pi f \epsilon_r}, \quad (24.6)$$

где σ'_L характеризует вклад постоянного или «низкочастотного» тока в удельную проводимость.

В широком диапазоне частот диэлектрические свойства любого материала между электродами не могут быть постоянными (т.е. материал обнаруживает диэлектрическую дисперсию) и, как и в случае импеданса модельной цепи на рис. 24.4, меняются между двумя «предельными» значениями ϵ'_L и ϵ'_∞ в соответствии с уравнением

$$\epsilon^* = \epsilon'_\infty = \frac{\epsilon'_L - \epsilon'_\infty}{1 + i\omega\tau}, \quad (24.7)$$

где, как и прежде $\tau = 1/2\pi f_c$ — постоянная времени. Уравнение (24.7) можно разбить на составляющие:

$$\epsilon' = \epsilon'_\infty + \frac{\epsilon'_L - \epsilon'_\infty}{1 + (\omega\tau)^2}, \quad (24.8)$$

$$\epsilon'' = \frac{(\epsilon'_L - \epsilon'_\infty)\omega\tau}{1 + (\omega\tau)^2}. \quad (24.9)$$

Зависимость ϵ'' от ϵ' имеет вид окружности с центром, расположенным на оси ϵ' . Часто, однако, оказывается, что в действительности центры таких полуокружностей лежат ниже оси абсцисс, что, как показано Коулами [56], можно описать уравнением

$$\epsilon^* = \epsilon'_\infty + \frac{\epsilon'_L - \epsilon'_\infty}{1 + (i\omega\tau)^{1-\alpha}}, \quad (24.10)$$

так что прямая между центром окружности и точкой пересечения зависимости ϵ'' от ϵ' с осью абсцисс образует с последней угол $\alpha\pi/2$ рад. Хотя подход Коул–Коула является целиком эмпирическим (обычно считают, что он характеризует вид распределения времен релаксации), в настоящее время принято представлять данные именно в виде графика Коул–Коула, характеризуя дисперсию «приращением» $\Delta\epsilon' = \epsilon'_L - \epsilon'_\infty$ и фактором Коул–Коула α . Предложено много других распределений времен диэлектрической релаксации [30, 147], однако они не получили широкого распространения при описании биологических систем и поэтому здесь не обсуждаются.

Дополнительно можно использовать график «комплексной проводимости» в виде зависимости σ'' от σ' , где

$$\sigma'' = 2\pi f \epsilon_r (\epsilon' - \epsilon''). \quad (24.11)$$

Как уже отмечалось, в обоих этих представлениях данные, полученные в разных частотных диапазонах, имеют разный вес. Это иллюстрирует рис. 24.8, на котором

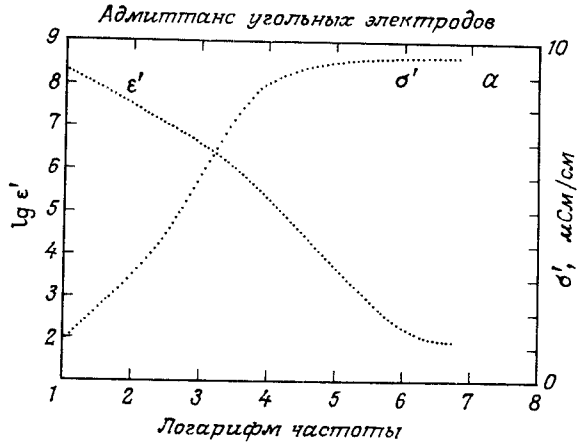
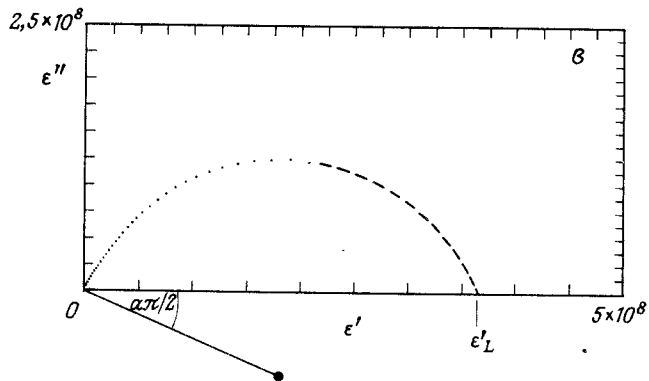
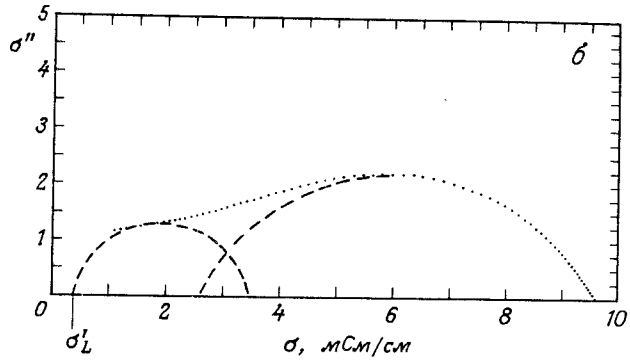


Рис. 24.8. Адмиттанс угольных электродов. Получение данных описано в подписи к рис. 24.4. а: активная и реактивная проводимости, найденные из измеренных значений емкости и проводимости через постоянную ячейку; б: график адмиттанса (комплексной проводимости), $\epsilon' = 78,4$. Из-за отсутствия удовлетворительного способа разделения перекрывающихся дисперсий (без дополнительных сведений) две полуокружности подбирали эмпирически. Экстраполяция правой полуокружности дает σ'_L , откуда можно найти $\Delta\sigma'$ для каждой дисперсии. в: график комплексной диэлектрической проницаемости (график Коул-Коула), построенный с использованием найденного выше (см. б) значения σ'_L . Показано определение фактора Коул-Коула α и экстраполяция (в область низких частот) для получения ϵ'_L . Как можно заметить, на этом графике две дисперсии неразличимы, что указывает на различный вес данных в графиках адмиттанса и комплексной диэлектрической проницаемости. Обратите внимание, что для данной дисперсии, для которой α не слишком велико, τ равно $\Delta\epsilon'_r/\Delta\sigma'$.



представлены результаты обработки импедансного спектра (рис. 24.6) углеродного электрода.

Как видно из рис. 24.8,а, при низких частотах кажущаяся диэлектрическая проницаемость системы достигает весьма больших значений ($2 \cdot 10^8$ при частоте 10 Гц), а измеряемая емкость составляет приблизительно 70 мкФ. Этот принцип лежит в основе конденсатора «электролитного» типа, используемого в электрических и электронных цепях. Конечно, диэлектрическая проницаемость электролита между электродами составляет только около 78, и если использовать эту величину в качестве «высоко-частотной» диэлектрической проницаемости, получится адмиттансная диаграмма, показанная на рис. 24.8,б. Как и на импедансной диаграмме (рис. 24.4), здесь можно выделить два процесса. Экстраполяция адмиттансной кривой в низкочастотную область дает значение σ'_l (равное 0,4 мОм/см), которое используют для построения диаграммы Коул – Коула на рис. 24.8,в. Как между прочим подчеркивает Макдональд, диаграмма Коул – Коула не совсем пригодна для описания *электрохимического* импеданса, поскольку определяемые диэлектрическая проницаемость и проводимость являются *собственными* свойствами материала, находящегося между электродами, и это следует иметь в виду. Тем не менее график, приведенный на рис. 24.8, служит хорошей иллюстрацией способа обработки экспериментальных данных, и можно надеяться, что такое элементарное толкование поможет любому новичку глубже разобраться в этих вопросах. Для полноты описания необходимо упомянуть, что иногда в литературе, особенно касающейся электрических изоляторов, используют термин коэффициент рассеяния $D = \operatorname{tg} \delta = \varepsilon''/\varepsilon'$. Для материалов, не обладающих проводимостью по постоянному току, $D = G/\omega C = 1/Q$, где Q – так называемая добротность.

Теперь мы более или менее в состоянии рассмотреть некоторые механистические причины частотной зависимости электрических свойств систем, помещенных между электродами и включающих не только ионные растворы, но и биологические материалы. Диэлектрические (пассивные электрические) свойства биологических материалов и различных химических [206] веществ давно (см., например, [157]) привлекают внимание исследователей как с чисто познавательной, так и аналитической точки зрения. Так, например, еще в 1899 г. Стюарт [204] заметил, что низкочастотная проводимость плазмы крови превышает проводимость цельной крови, из которой она получена, на величину, являющуюся монотонной функцией гематокрита, и вывел уравнение, позволяющее по проводимости оценивать гематокрит. С тех пор по этому вопросу накоплена обширная литература. Она непрерывно пополняется, и ее объем слишком велик, чтобы дать адекватный ее обзор в этой книге. Поэтому автор хотел бы ограничиться следующими моментами: 1) обратить внимание читателя на многие превосходные книги, обзорные статьи и монографии по диэлектрической спектроскопии биологических веществ; 2) рассмотреть вкратце наиболее важные особенности диэлектрических дисперсий, описанные для биологических систем, механистические модели, описывающие такие системы, и соотношения между диэлектрическими свойствами и эффективным дипольным моментом молекул, для которых наблюдается дисперсия; 3) описать некоторые методы анализа и приборы, используемые на практике или разработанные, в основе которых лежат измерения проводимости, диэлектрической проницаемости или их векторной суммы. Далее предполагается вкратце рассмотреть некоторые технические и методологические аспекты, которые следует учитывать при проведении измерений импеданса биологических систем, обращая особое внимание на различия между релаксационными измерениями и измерениями в широком диапазоне частот. Отсюда мы перейдем к обсуждению временного степенного анализа (фурие-анализа) в области биосенсоров вообще. И наконец, попытаемся свести вместе рассмотренные выше идеи и факты, чтобы найти новые подходы к конструированию и эксплуатации биосенсоров.

24.6. Диэлектрическая спектроскопия биологических веществ

Из множества книг, посвященных диэлектрическим свойствам конденсированных веществ, особенно рекомендуем [54, 58, 91, 100, 163, 178], как имеющие наибольшее отношение к биологии. Несколько превосходных обзоров написано старейшим исследователем в области измерений импеданса биологических объектов Шваном [183, 184, 187–191, 193, 207]. Общее представление об этом предмете можно также получить из обзорных статей [164, 167, 168, 178, 226]. В работе [164] подробно обсуждается приложение этого метода к белкам. Этот вопрос рассматривается также в обзорах [88–90, 101, 119, 120, 156, 210, 211, 218]. Наши собственные работы [94, 95, 97, 116, 117, 118] в основном касались микробных мембран, причем в двух последних статьях имеется довольно обширный обзорный материал. Можно также отметить ряд работ по природным мембранам [9, 11, 69, 109, 160, 161], чисто фосфолипидным везикулам [7, 169, 175, 194] и плоским мембранам [73, 92, 103, 128, 214]. Введением в литературу по мембранам микробов могут служить также работы [8, 10, 22, 50, 51, 96, 159]. Почти все заряженные полиэлектролиты обладают чрезвычайно высокой диэлектрической проницаемостью при низких частотах (см., например, [66, 155]). Поведение ДНК при низких частотах в той или иной степени обсуждается в работах [201, 217]. В большинстве упомянутых в этом разделе работ измерения проводили при частотах ниже 100 МГц. Явления в области более высоких частот, которые мы до сих пор не затрагивали, обсуждаются авторами [52, 53, 76, 77, 79, 107, 125, 141, 209]. Этот список ясно показывает обширность и глубину литературы по измерениям импеданса у биологических объектов. Какие же полезные сведения можно извлечь из этих работ?

Обычно подчеркивают, что в дисперсии диэлектрической проницаемости клеток и тканей можно выделить три более или менее отчетливо выраженные широкие полосы, соответствующие низко-частотному, радио- и СВЧ-диапазону и обозначаемые как α -, β - и γ -дисперсии. Можно также отметить подобласти δ - β_1 -дисперсий, расположенные между β - и γ -дисперсиями и особенно выраженные в случае белковых растворов [66, 88], а также низкочастотную μ -дисперсию, описанную автором и его коллегами [95, 97, 116]. Предполагается, что в основе этих дисперсий лежат следующие основные механизмы: релаксация ионного облака в направлении, тангенциальном заряженным поверхностям мембран (α -дисперсия); релаксация типа Масквелла – Вагнера на границе раздела между клеточными мембранами с низкой проводимостью и окружающими их водными растворами (β -дисперсия); вращение небольших заряженных молекул и/или диполей (γ -дисперсия); релаксация связанной в ткани воды (δ -дисперсия); вращение белков (β_1 -дисперсия) и диффузионное движение компонентов мембраны (μ -дисперсия). Принцип суперпозиции (в тех случаях, когда он применим) гласит, что все эти механизмы независимы и аддитивны. Здесь мы хотели бы только подчеркнуть, что *любая* потенциальная подвижность заряда или диполя приводит к возникновению дисперсии диэлектрической проницаемости. В этом смысле вращение диполей электрически неотлично от любых других движений, например перескакивания зарядов между различными центрами [114, 129, 159]. Поэтому очевидно, что в основе наблюдающихся на практике широких дисперсий диэлектрической проницаемости может лежать множество разных механизмов.

Как уже говорилось, дисперсию диэлектрической проницаемости можно охарактеризовать разностью ее низкочастотной и высокочастотной диэлектрических проницаемостей, «средним» временем релаксации и шириной распределения времен релаксации, выражаемой фактором Коул – Коула a . Теперь можно сказать, что разность низко- и высокочастотной диэлектрических проницаемостей является внешним или видимым признаком такой молекулярной характеристики, как дипольный момент (или эффективный дипольный момент в случае перескакивания зарядов и т. п.). Дипольный

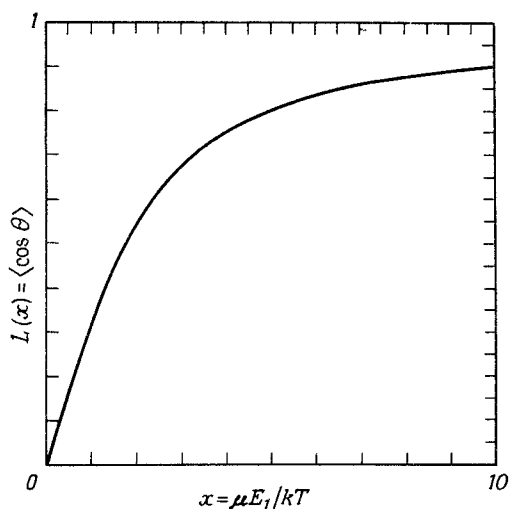


Рис. 24.9. Функция Ланжевена. Она связывает величину среднего угла θ между низкочастотным (относительно f_c) полем и направлением представляющего интерес (эффективного) диполя с напряженностью поля E_1 и эффективным дипольным моментом μ . По оси ординат отложена величина $\langle \cos \theta \rangle$, а по оси абсцисс $\mu E_1 / kT$, где k — константа Больцмана и T — абсолютная температура. При $x (= \mu E_1 / kT) < 1$ функция Ланжевена переходит в уравнение $\langle \cos \theta \rangle = \mu E_1 / 3kT$, а разность диэлектрических проницаемостей становится независимой от напряженности поля. Таким образом, в этой области функция Ланжевена линейна, а число частиц, фактически движущихся под воздействием электрического поля, пропорционально E_1 .

момент традиционно измеряют в дебаях (Д); $1 \text{ Д} = 3,33 \cdot 10^{-30} \text{ Кл} \cdot \text{м}$, или иными словами, поскольку единичный заряд равен $1,6 \cdot 10^{-19} \text{ Кл}$, пара единичных зарядов противоположного знака, разделенных расстоянием 10^{-10} м (1 \AA), имеет дипольный момент $4,8 \text{ Д}$. Молекулярный дипольный момент показывает, какая доля диполей фактически ориентирована при данной напряженности поля в соответствии с функцией Ланжевена (рис. 24.9):

$$L(x) = \text{cth}(x) - 1/x, \quad (24.12)$$

где $x = \mu E_1 / kT$; E_1 — локальное электрическое поле; k — константа Больцмана; T — абсолютная температура. Поскольку, особенно в случае сложных биологических систем, известно, как правило, только макроскопическое поле (т.е. отношение максимальной разности потенциалов между электродами к расстоянию между ними), а не локальное поле, то целесообразно использовать первую величину с добавлением некоторой эмпирической константы. При изучении вращения в водных растворах глобулярных белков используют множитель $H = 5,8$ (полученный из сравнения теории и эксперимента для аминокислоты глицина [156]). В этом случае

$$\mu = \sqrt{9000kT\Delta\epsilon' / 4\pi N_A H c}, \quad (24.13)$$

где N_A — число Авогадро; c — молярная концентрация белка. Наблюдаемые на практике значения дипольных моментов белковых растворов эквивалентны примерно 1–15 единиц относительной диэлектрической проницаемости на $g/100 \text{ мл}$, что соответствует приблизительно 5–20 Д на кДальтон [86, 188]. Отсюда можно рассчитать, что в типичных экспериментах с использованием диэлектрических измерений, в которых напряженность поля, как правило, не превышает $0,5 \text{ В/см}$, составляя обычно всего $1/10$ этой величины, значение функции Ланжевена очень мало, так что число действительно вращающихся белковых молекул составляет исключительно малую долю от их общего числа. У нас будет повод вернуться к этому позже.

Поскольку вопросы, рассмотренные в данном разделе, важны для всего нашего обсуждения, в заключение сделаем ряд замечаний:

1) существует обширная литература, показывающая, что диэлектрические свойства

всех типов клеток, тканей и биомолекул отличны от диэлектрических свойств простого ионного раствора;

2) поскольку диэлектрическая спектроскопия является неразрушающим методом, его можно использовать для анализа биологических материалов в растворах;

3) сильная зависимость диэлектрических свойств от частоты позволяет анализировать различные вещества или различные их характеристики путем выбора различных частот;

4) в таких случаях ценную информацию может дать выяснение областей происхождения силовых линий;

5) на практике из-за относительно низкой чувствительности метода и ширины получаемого спектра (отражающего скорее релаксацию, чем резонанс), по-видимому, наиболее целесообразны «объемные» измерения. С биоаналитической точки зрения следует также добавить, что, особенно при низких частотах, наряду с диэлектрическими свойствами материала между электродами на результаты измерений могут существенно влиять и свойства самих электродов. Это, однако, само по себе не снижает потенциальной полезности рассматриваемого метода. Отметим также, что в вышедшей недавно превосходной книге Кэмпбелла и Дюка [42] концепция диэлектрической спектроскопии даже не упоминается. Это явно указывает на то, что метод уже необходимо начинать широко использовать.

С этим мы и перейдем к обсуждению некоторых работ, нацеленных на использование описанных выше принципов в аналитических приборах.

24.7. Использование кондуктометрии и импедансометрии в биоанализе

Эта область, очевидно, также необъятна, и поэтому мы постараемся отобрать лишь те примеры, которые помогут привлечь внимание к практическому применению указанных методов. Так, в последнее время возрастает интерес к применению импедансометрии для оценки числа микроорганизмов в суспензионных популяциях [74, 96], поскольку электрические свойства микробной культуральной среды, как было известно еще в прошлом веке [205], связаны с ростом микробов. В книге [74] рассмотрено применение кондуктометрии (см., например, [142,177]), импедансометрии [41] и емкостных измерений [75]. В последнем случае изменения, особенно связанные с микроорганизмами, проявляются по их влиянию на электроды [102], поскольку диэлектрическая проницаемость самого раствора или среды меняется незначительно.

При частотах ниже частот максвелл-вагнеровской β -дисперсии электрическая проводимость суспензии ниже проводимости среды, в которой суспендировано вещество. Таким образом, о наличии суспендированного материала можно судить непосредственно по его влиянию на электрическое поле. Такие измерения проводят как в объеме суспензии (см., например, [94, 108, 133]), так и в гидродинамически сфокусированных потоках в приборах, устроенных по принципу счетчика Культера [64, 126]. Импедансометрию успешно применяют для непосредственной оценки биомассы микробов [22, 50, 51], причем, как показали исследования, наши и других авторов, диэлектрические свойства клеток данного радиуса монотонно зависят от объемной доли суспензионной фазы.

Что до возможности дифференциации и идентификации клеток по частотной зависимости их диэлектрических свойств, ясно, что наряду с другими отличиями различные бактерии имеют разные размеры и поверхностные заряды (плотности зарядов). Например, грам-положительные и грам-отрицательные бактерии характеризуются совершенно различными α -дисперсиями [95]. Однако размеры и поверхностные заряды микроорганизмов сильно зависят как от pH, так и от их физиологического состояния (например, скорости роста), поэтому маловероятно, чтобы простые диэлект-

рические спектры содержали информацию, достаточную для диагностики без каких-либо других тестов. Аналогично в неразрушенных клеточных суспензиях доминирующий вклад в диэлектрические свойства дают самые большие клетки, так что интерпретация данных, исходно затруднительная, здесь скорее всего вообще невозможна, кроме самых благоприятных случаев. Автор, однако, не видит причины, почему бы не распространить метод со счетчиком Культера и на измерения *зависимых от частоты* электрических свойств отдельных клеток. В частности (см. также ниже), используемые в счетчике Культера электрические поля делают возможным использовать для данной цели нелинейные электрические характеристики клеток, а они, как можно ожидать, сильнее зависят от специфических особенностей клеток, чем просто линейные электрические характеристики. Таким образом, хотя и нельзя предполагать, чтобы диэлектрическая спектроскопия суспензий микробных клеток позволила выявлять отдельные микроорганизмы (более продуктивным могло бы быть определение колоний), использование более совершенных методов действительно открывает некоторые возможности в смысле охарактеризования неизвестных клеток. Однако, поскольку, опубликованные до сих пор диэлектрические спектры микроорганизмов охватывают не более десяти различных видов (неизвестного физиологического состояния), предстоит еще проделать большую работу, прежде чем можно будет адекватно оценить многие обещающие возможности этой области.

Другие довольно широко используемые методы, связанные с измерением объемной диэлектрической проницаемости, проводимости или импеданса клеток и тканей, — это импедансная плетизмография [4, 33, 154, 222] и пневмография [104, 158]. Измерения диэлектрических свойств вырезанной ткани используют для определения свежести [170, 122, 123, 215] и качества [165] пищевых продуктов. Что касается измерений в тканях, то здесь следует также упомянуть значительное локальное понижение импеданса кожи в области меридиональных точек, играющих важную роль в акупунктуре [15, 111]. Нахождение таких точек путем измерений импеданса, и это нетрудно доказать, является биосенсорной процедурой в строгом смысле слова.

Измерения проводимости гомогенных растворов, очевидно, наиболее широко используют при мониторинге окружающей среды. Этот метод хорошо подходит и для оценки солености морской воды (см., например, [18, 34, 223]). Аналогично в геодезических изыскательских работах применяют методы, связанные с измерениями электрического сопротивления пород, хотя физическая и механистическая интерпретация данных и здесь далеко не проста [100, 166]. Отметим также, что можно достичь хорошего временного разрешения измерений проводимости, используя частоты, соответствующие микроволновой области [62]. В работе [181] проводится полезное обсуждение элегантного кондуктометрического метода определения размеров газовых пузырьков и распределения скоростей в микробных ферментерах. Возможности импедансометрии для контроля хроматографических элюентов рассматриваются, например, в работе [3].

Что касается применения кондуктометрии в биосенсорах вообще, авторы [13, 134, 135] недавно подчеркнули, что большинство реакций, используемых в потенциометрических и амперометрических ферментных электродах, например зависящие от концентрации мочевины изменения pH и pI в электродах, содержащих уреазу, могут быть на том же уровне, или лучше, оценены кондуктометрически. Аналогично авторы [6] использовали связанные с ферментативной реакцией изменения емкости двойного электрического слоя симметричных металлических электродов как меру активности фермента или субстрата. Такие измерения стремятся проводить на одной частоте, не обсуждая вопрос о том, что в случае многочастотных измерений могли бы получиться более селективные и информативные сенсоры.

Наконец, упомянем использование кондуктометрии для улучшения времени откли-

ка [171] и селективности [172] ионоселективных электродов, обычно используемых в потенциостатическом режиме. Исходя из особенностей рассмотренного выше импеданса электродов, для этих измерений найден оптимальный временной (частотный) диапазон. В данном случае использовали запаздывание 0,1 мс между стимулирующим импульсом и измеряемым откликом системы.

Естественно, таких примеров можно было бы привести намного больше. Хотелось бы, однако, чтобы читатель усвоил, что при правильном выборе соответствующих частот и/или матрицы пробы с помощью импедансометрии в различных ее вариантах можно контролировать большое количество жизненно важных факторов в реальном масштабе времени и без разрушения исследуемого объекта, а также что измеряемые в таких системах сигналы обуславливаются свойствами электрода, объема раствора или границы раздела фаз. Эта концепция приводит нас к необходимости краткого обсуждения некоторых технических аспектов измерений.

24.8. Импедансометрические системы

До сих пор мы почти не уделяли внимания техническим и инструментальным вопросам импедансометрии, поскольку обычно пользователю достаточно знать, что применяемые им методы вытекают непосредственно из лежащих в их основе принципов. В ряде обзоров обсуждаются импедансные измерения в химических [17, 21, 105, 132, 173, 176, 196, 213] (см. также приведенные выше ссылки на работы по электрохимическим системам), а также в биологических системах [61, 91, 100, 143, 163, 184] в диапазоне до приблизительно 30 МГц. Эта частота выбрана в качестве критерия потому, что примерно в этой точке длина волны электромагнитного излучения приближается к размерам измерительной системы, так что при больших частотах рассмотренное выше описание электрической цепи перестает быть применимым и необходимо перейти к теории поля, основанной на уравнениях Максвелла (см., например, [24, 48, 131]). В этих условиях импеданс электродов становится пренебрежимо малым. Представление о состоянии работ по методологии высокочастотных измерений можно получить из статей [12, 40, 60, 77, 203, 208]; к этому вопросу мы больше не будем возвращаться.

При частотах ниже 10^7 – 10^8 Гц широко применяют различные мосты (рис. 24.10). Раньше использовали мосты, уравниваемые вручную, но современные приборы управляются компьютерами и являются автобалансирующимися. Для получения диэлектрических спектров очень удобны частотные анализаторы [80, 151], хотя

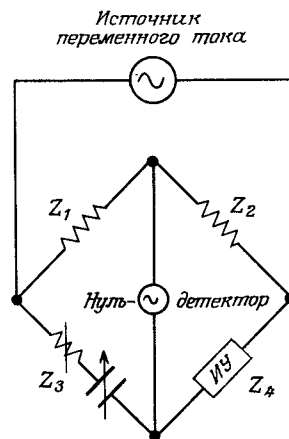


Рис. 24.10. Принцип двухплечевого импедансного моста. Исследуемое устройство (ИУ) образует одно плечо моста (Z_4), что во многом сходно с известным мостом Уинстона, за исключением того, что источником тока является генератор синусоидального напряжения переменной частоты, нуль-детектор чувствителен к переменному току, а регулируемое плечо моста (Z_3) содержит как активное сопротивление, так и емкость. Если мост уравновешен (т.е. в части цепи, содержащей нуль-детектор, не течет никакого тока) и если $Z_1 = Z_2$, то $Z_3 = Z_4$, поскольку в общем случае $Z_1 Z_4 = Z_2 Z_3$.

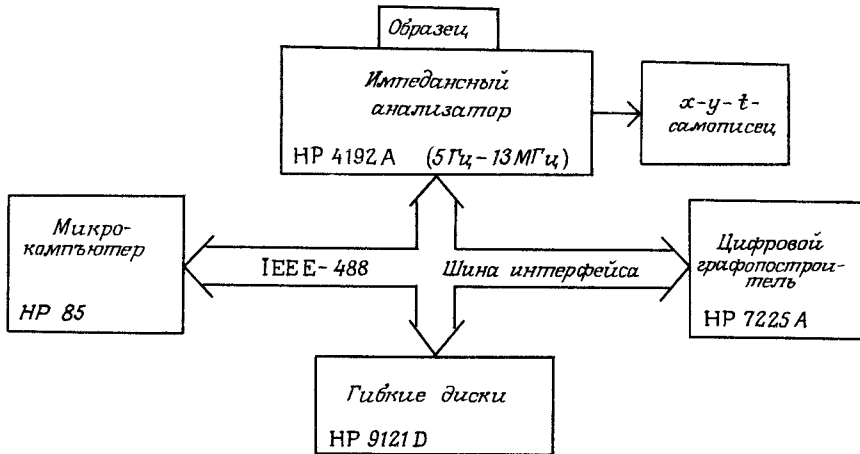


Рис. 24.11. Управляемый компьютером диэлектрический спектрометр, состоящий из доступных серийно выпускаемых компонентов и работающий в диапазоне 5 Гц–13 МГц. Микрокомпьютер управляет импедансным анализатором, хранит данные как в ОЗУ, так и на дисках, позволяет строить разнообразные графики (см. рис. 24.4, 24.6, 24.8, а также [94]).

они и несколько менее точны. Автор использовал систему, схематически показанную на рис. 24.11. В этой системе с помощью векторного вольтметра и амперметра измеряют V_m , i_m и θ , причем все необходимые данные могут быть рассчитаны и выведены на дисплей. Сборка системы на основе стандартного интерфейса IEEE-488 делает ее исключительно удобной в обращении, причем она позволяет проводить логарифмическое сканирование по всему диапазону со скоростью 6 с (или 20 измеряемых частот) на декаду. В системах этого типа в каждый момент времени накладываются синусоидальные напряжения только одной частоты, и поэтому такие методы называют частотными.

В системах рассмотренного выше типа обычно проводят двухэлектродные измерения. Это, однако, означает, что всегда измеряется импеданс исследуемого образца *плюс* электроды. Последние же, особенно при низких частотах и высокой проводимости, могут давать основной вклад в результаты измерений, что не представляет научного или практического интереса. В таких случаях более эффективны четырехэлектродные методы (рис. 24.12), в которых в принципе исключаются проблемы поляризации [152, 184–186, 192], хотя и необходим тщательный анализ точного расположения силовых линий электрического поля [182, 192]. В таких случаях постоянная ячейки определяется положением электродов, к которым подводится напряжение от внешнего источника

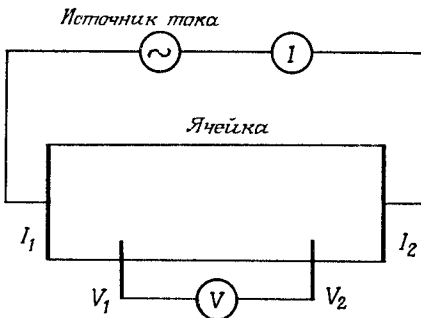


Рис. 24.12. Принцип четырехэлектродного метода измерения низкочастотного импеданса в объеме раствора с минимальными помехами от импеданса границ раздела электрод–электролит. Ток, генерируемый источником переменного тока, проходит через два «токовых» электрода (I_1 и I_2) и измеряется амперметром. Падение напряжения на соответствующем участке системы измеряют с помощью двух «улавливающих» электродов (V_1 и V_2), связанных с вольтметром с высокоимпедансным входом. Током через измерительные электроды можно пренебречь, и поэтому их поляризация не оказывает влияния на измеряемый импеданс [72, 192].

[212]. Поляризацию электродов обычно минимизируют, используя электроды, покрытые платиновой чернью (см., например, [184]). Такие электроды получают с помощью электролиза в растворе Кольрауша [85].

В последние годы получили распространение релаксационные методы. В таких методах на исследуемый образец накладывают ступеньку напряжения и контролируют, в зависимости от частотного диапазона, либо изменяющийся во времени ток заряжения (разряжения), либо изменение формы сигнала эквивалентной RC -цепи. Расшифровка релаксационных кривых, обычно с использованием быстрого преобразования Фурье (см. ниже), дает такие же результаты, как анализ частотной зависимости диэлектрических свойств. Эти методы пригодны как при высоких (см., например, [28, 40, 55, 60, 203, 208]), так и при низких частотах [67, 98, 150, 180, 197].

Концепция эквивалентности релаксационного и частотно-зависимого поведения системы приводит в конце концов к естественной мысли, что для оценки пассивных электрических свойств системы можно использовать зондирующие волновые сигналы любой формы, и в хорошем приближении это верно. Поэтому в обзор включен раздел, дающий представление о современных методах анализа сигналов.

В заключение этой части обзора автор хотел бы снова подчеркнуть, что 1) всегда необходимо тщательно учитывать, в какой мере поляризация электродов вносит вклад в измеряемый импеданс биологической системы, и 2) необходимо принимать во внимание расположение силовых линий электрического поля между электродами.

24.9 Анализ спектров как неотъемлемый элемент биосенсорных измерений

В общем случае для анализа частотной зависимости отклика системы на зондирующий импульс (см., например, [113, 172]) чаще всего используют те же средства, что и для соответствующей обработки сигналов, меняющихся во времени, или «временных рядов» (например, [16, 29, 45]). Применяют, в частности, различные преобразования, такие как преобразования Фурье [24, 31, 44, 144–146]. И хотя можно назвать и более совершенные подходы и способы обработки [2, 46, 47, 49, 78, 84, 115], мы вкратце обсудим здесь стандартные подходы, применяемые к линейным, стационарным или периодическим (квази-) эргодическим сигналам.

Любой периодический сигнал $x(t)$ с периодом T можно представить рядом Фурье, который запишем в виде

$$x(t) = \sum_{-\infty}^{\infty} C_n e^{i2\pi ft}, \quad (24.14)$$

где

$$C_n = \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} x(t) e^{-i2\pi ft} dt. \quad (24.15)$$

Здесь $i = \sqrt{-1}$, а «основная частота» $f = 1/T$. Запишем ряд Фурье также в виде

$$S_x(f) = F[x(t)] = X_0 + X_1(\cos 2\pi ft + i \sin 2\pi ft) + X_2(\cos 4\pi ft + i \sin 4\pi ft) + \dots + X_n(\cos 2n\pi ft + i \sin 2n\pi ft). \quad (24.16)$$

Для непериодических данных непрерывное представление спектра получают с помощью интеграла Фурье:

$$X(f) = \int_{-\infty}^{\infty} x(t) e^{-i2\pi ft} dt. \quad (24.17)$$

Эти уравнения связывают сигналы, измеряемые в виде временной и частотной

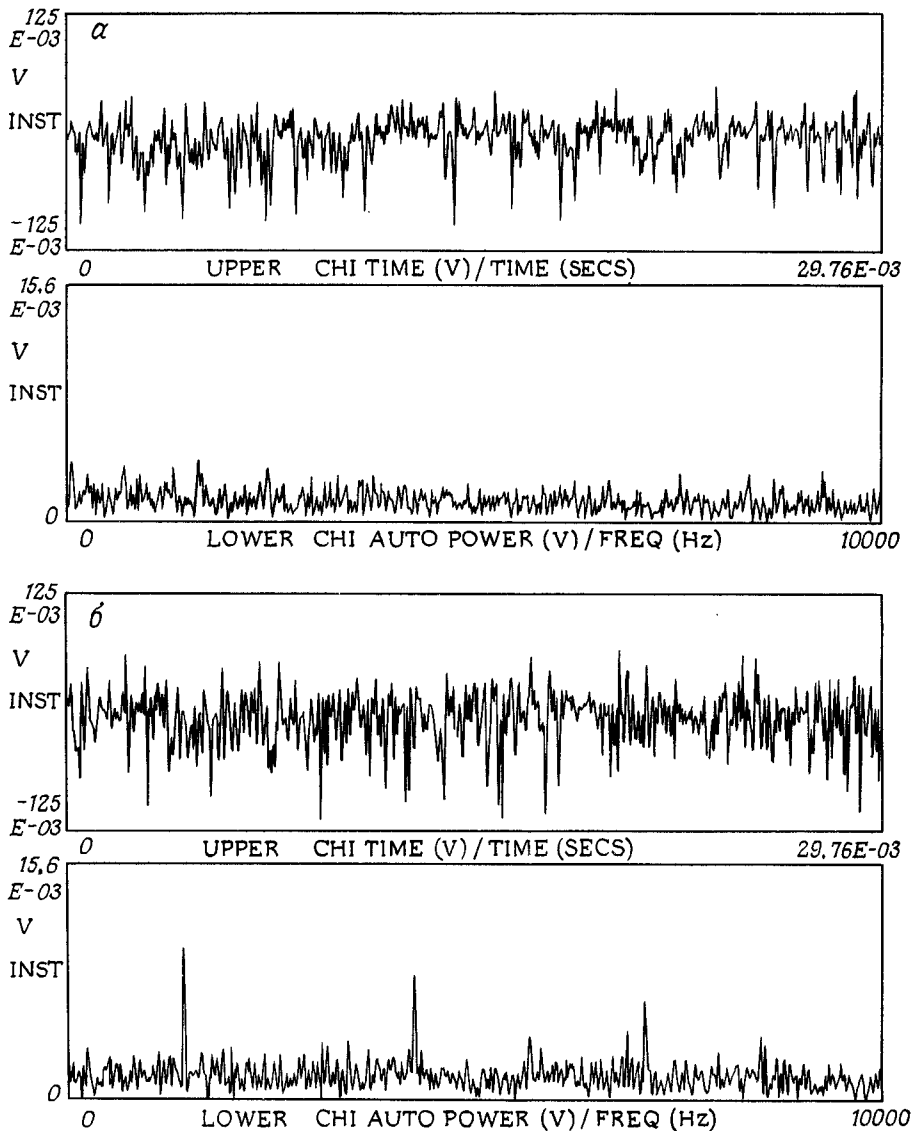


Рис. 24.13. Два «случайных» сигнала и их спектры мощности флуктуаций. В верхней части каждого рисунка (а и б) показан временной ход сигнала, а нижняя представляет собой спектр мощности этого сигнала. Видно, что хотя степени «неупорядоченности» исходных данных в обоих случаях кажутся одинаковыми, из спектра мощности ясно, что сигнал (б) содержит значимую компоненту с частотой около 1,4 кГц. В действительности в обоих случаях сигнал генерировали генератором «белого шума», но в случае (б) его смешивали с сигналом генератора переменного тока, работающим на частоте 1420 Гц. Данные анализировали с помощью Solartron 1200 Signal Processor, а для построения графиков использовали цифровой графопостроитель Hewlett - Packard 7470.

зависимостей. Они же показывают, что любой сигнал можно представить как сумму синусоид определенной частоты, амплитуды и фазы.

Предположим, что имеется на первый взгляд «хаотический» сигнал, например такой, как в верхней части рис. 24.13,а, и мы хотим охарактеризовать его и решить, например, в какой степени он отличается, и отличается ли вообще от другого сигнала, также кажущегося неупорядоченным (например, сигнала в верхней части рис. 24.13,б). Обычный способ решения этой проблемы заключается в определении автокорреляционной функции $R_x(\tau)$, характеризующей степень корреляции этого сигнала с его смещенной копией:

$$R_x(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} 1/T \int_0^T x(t) \cdot x(t + \tau) dt. \quad (24.18)$$

При нулевом смещении времени ($\tau = 0$) значение $R_x(t)$ равно среднему квадратическому значению сигнала $x(t)$. Автокорреляционная функция чисто случайного сигнала («белый шум») не зависит от t . Такую функцию используют, например, для непрерывной оценки постоянной времени электродов [116].

Автокорреляционная функция представляет собой обратное преобразование Фурье спектра мощности флуктуаций $G_x(f)$, т. е.

$$R_x(\tau) = F^{-1}[G_x(f)],$$

и описывает общий частотный состав временного ряда как спектральную плотность его среднеквадратических значений:

$$G_x = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} 1/(\Delta f) \left[\lim_{T \rightarrow 0} \frac{1}{T} \int_0^T x^2(x, t, \Delta f) dt \right]. \quad (24.19)$$

(Фазовые отношения в автокорреляционной функции и спектрах мощности (флуктуаций), таким образом, игнорируются.) Рис. 24.13 иллюстрирует «извлечение» периодического сигнала из «зашумленных» данных с помощью спектра мощности флуктуаций. Судя по виду исходных временных зависимостей, имеющих характер типичного шума, едва ли можно предположить возможность их аналитического использования, однако из спектра мощности ясно видно (рис. 24.13,б), что сигнал на самом деле содержит значащую компоненту с частотой примерно 1,4 кГц (плюс гармоника), и в этой области спектра отношение сигнал/шум вполне приемлемо для аналитических целей.

В проведенном выше анализе рассматривали единственный сигнал. Можно определить также перекрестную корреляционную функцию $R_{xy}(\tau)$ для сигналов $x(t)$ и $y(t)$:

$$R_{xy}(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_0^T x(t) \cdot y(t + \tau) dt. \quad (24.20)$$

Эта функция показывает, в какой степени один сигнал коррелирует с другим. Она представляет собой обратное преобразование Фурье так называемого перекрестного спектра мощности флуктуации $G_{xy}(f)$, т. е.

$$R_{xy}(\tau) = F^{-1}[G_{xy}(f)]. \quad (24.21)$$

Эти представления можно, наконец, использовать для определения передаточной функции системы $H(f)$, которая характеризует связь вход/выход обобщенной передаточной системы. Таким образом, если в исследуемой системе, например такой, как показано на рис. 24.1,а, входной сигнал $x(t)$ имеет спектр мощности $G_x(f)$, а выходной сигнал $y(t)$ модифицируется в системе так, что ему соответствует перекрестный спектр мощности флуктуаций $G_{xy}(f)$, то

$$H(f) = G_{xy}(f)/G_x(f). \quad (24.22)$$

Следовательно, в принципе для получения передаточной функции можно использовать любой входной сигнал. Это относится и к импедансу, поскольку и в этом случае можно определить передаточную функцию. В обозначениях, приведенных на рис. 24.1 и 24.2, ее можно записать так:

$$Z(f) = |Z(f)|e^{i\theta(f)}. \quad (24.23)$$

По причинам, связанным с временем измерения, на практике предпочитают сигналы определенной формы [57, 83]. Аналогично точность определения передаточной функции повышается путем усиления частотных компонент, связанных с временами релаксации исследуемой системы (см. также [117]). Тем не менее, несмотря на необходимость усреднения, «псевдослучайный» входной сигнал часто используют в нейрофизиологии [61, 71, 143] и в исследованиях диэлектриков [152]. Пример применения такого сигнала показан на рис. 24.13.

Таким образом, можно констатировать, что анализ спектров, будучи уже сейчас исключительно важным и полезным, по мере развития цифровой электронной техники будет становиться все дешевле, область его применения будет расширяться, а значение возрастать. (Все спектральные функции, использованные при построении рис. 24.13, реализованы с помощью соответствующей аппаратуры в реальном масштабе времени.) Хотя обсуждение вопросов анализа спектров включено в эту главу как естественное дополнение адмиттансной спектроскопии, хотелось бы подчеркнуть, что вообще анализ спектров, т.е. то, что часто называют распознаванием образов, должен рассматриваться всеми исследователями как неотъемлемая часть проектирования биосенсоров. Следует, правда, отметить, что хотя эти методы уже давно используют в фотометрических системах (см., например, [19]), а фурье-анализ широко применяют в ЯМР и ИК-спектроскопии и т.п. [42, 146], масштаб их применения в биосенсорных системах значительно меньше, чем они заслуживают. В связи с этим целесообразно завершить обзор рассмотрением двух возможных приложений флуктуационного или спектрального анализа, в том числе в ферментационной технологии, в настоящее время лежащей в русле собственных интересов автора.

24.10 Использование кондуктометрических корреляционных функций для оценки двухфазных потоков в биореакторах

Многие системы, такие как лабораторные и промышленные биореакторы и ферментеры, характеризуются весьма сложной динамически многофазностью жидкостей [36]. Отвлекаясь от особенностей, в данном случае вещества частиц и биологических клеток, такие системы можно широко моделировать гетерогенной суспензией непроявляющих пузырьков газа в ионном водном растворе. При данной постановке вопроса очевидно, что измерение проводимости (или вообще импедансометрия) может служить удобным способом измерения прохождения газовых пузырьков аналогично принципу, используемому в счетчике Культера [96]. В частности, при помощи биореактора с несколькими зондами можно оценить перекрестные корреляционные функции и/или когерентность флуктуаций проводимости между зондами, а затем непосредственно определить не только размер пузырьков и динамику жидкости, но и скорость прохождения пузырьков [37, 28, 181, 195]. Ценную информацию о динамике смешивания в двухфазных биореакторах, причем в реальном масштабе времени, можно получить при помощи анализа спектров флуктуаций давления [87]. Другие способы получения такой информации неизвестны.

Развивая эти идеи, можно безошибочно констатировать, что «проблема увеличения сигнала» [130] в значительной степени обусловлена тем фактом, что в принятой измерительной практике рассматривают только средние значения сигналов датчиков, а

не их (быстрые) флуктуации относительно среднего. Должно быть очевидно, что характеристика «состояния» клеточной культуры посредством измерений в окружающей среде требует *полного* описания временной зависимости этих измерений, включая их флуктуации. По нашему мнению, эта область является одной из наиболее плодотворных, и можно ожидать ее прогресса в будущем.

Несмотря на то что в этом разделе обсуждалась методика анализа сигнала на примере сигналов, генерируемых макроскопическими датчиками в микробных ферментерах, в заключение хотелось бы обсудить потенциально новый подход в области биосенсоров в строгом смысле этого слова, основанный на измерении нелинейной электрической передаточной функции в относительно микроскопических белоксодержащих системах.

24.11 Использование в биосенсорных устройствах многомерных диэлектрических спектров внутримолекулярных движений в белках

Подавляющее большинство биосенсорных приборов, предложенных или реализованных к настоящему времени, основано на непосредственном соседстве фермента (или белка) и потенциометрического либо амперометрического электрода. Здесь хотелось бы обсудить возможность использования специфического *нефарадеевского* или *нелинейного* электрического поведения белков, связанных с электродами (или находящихся вблизи них).

Становится общепризнанным, что в белковых кристаллах или чисто водных растворах глобулярных белков атомы претерпевают множество сложных флуктуаций около их среднего положения, даже когда они находятся в термодинамическом равновесии (при температуре выше 0 К) (см., например, обзоры [200, 219, 221] и цитируемую в них литературу). Такие внутримолекулярные флуктуации не являются полностью независимыми друг от друга [119]. Более того, поскольку белки содержат множество заряженных частиц и диполей, можно ожидать, что внутримолекулярные подвижности таких групп будут, во-первых, белок-специфичными и, во-вторых, зависимыми от связывания с субстратом (лигандом), ферментативной активности или преобразования энергии [220]. Таким образом, оценка динамики белков неинвазивными методами диэлектрической спектроскопии могла бы лечь в основу разработки целого семейства новых биосенсорных устройств (поскольку этот принцип может быть применен к любому взаимодействию белок-лиганд, в том числе белок-белок). Однако, поскольку (линейные) диэлектрические дисперсии белков имеют довольно широкий диапазон (вероятно, отражающий многочисленные процессы, вносящие вклад в наблюдаемые макроскопические эффекты), проблема сводится к обработке сигналов, т.е. к *расшифровке* диэлектрических спектров. С этой целью мы предлагаем использовать 1) *нелинейные* диэлектрические свойства белков (а реально и любых других макромолекул) и 2) дву- или многомерный анализ электрических передаточных функций систем белок-лиганд. Необходимо также обсудить, какой частотный диапазон наиболее подходит для максимального увеличения белок-специфичной составляющей сигнала.

Как отмечалось выше, доля зарядов или диполей, фактически движущихся под действием электрического поля соответствующей частоты, задается функцией Ланжевена (см. рис. 24.9). Отсюда, в частности, следует, что для приведения диполя данного типа, допустим, на 80% к его предельному положению необходимо, чтобы величина $\mu E_1/kT$ была больше 5, а это значение существенно выходит за пределы линейного диапазона (см. рис. 24.9). Поскольку многие эффективные *внутримолекулярные* дипольные моменты, лежащие в области наших интересов, вероятно, не превышают 24 Д и поскольку при 298 К величине $\mu E_1/kT = 5$ соответствует поле $6,159 \cdot 10^9 \text{ В} \cdot \text{м}^{-1} \text{ Д}^{-1}$



К генератору
и анализатору

Рис. 24.14. Принцип использования комбинированных электродов для получения высокой напряженности поля при относительно низком напряжении. Электроды имеют довольно большую поверхность, вследствие чего их импеданс невелик. Электроды (показан вид сверху) расположены близко друг к другу (на расстоянии ~ 1 мкм или меньше) и подключены к генерирующей сигнал и измерительной цепи. Исследуемый белок или биологический компонент помещают на поверхность устройства (либо ковалентно пришивая его, либо закрепляя иным способом) и оценивают лиганд-зависимые изменения в многомерном диэлектрическом спектре. В качестве переменных для получения многомерной матрицы служат f_1 , f_2 , E_1 , E_2 и t (пояснения в тексте).

[117], для эффективного воздействия на эти диполи требуется напряженность поля порядка $2,5 \cdot 10^8$ В/м. Таким образом, чтобы напряжения на электродах были малы или хотя бы реально достижимы, необходимо, чтобы расстояние между электродами было как можно меньше. В данном случае конструктивно пригодны вставленные или комбинированные электроды (например, на силиконовой подложке) (рис. 24.14), используемые, в частности, в системе *Eumetric*TM (фирма Micromet Instruments Inc., Кеймбридж, Массачусетс, США) для измерения низкочастотной диэлектрической проницаемости.

Поскольку различные заряженные и дипольные группы образуют белок-специфические внутримолекулярные связи, наложение поля (такого, что $\mu E_1/kT$ больше, допустим, 5) одной частоты будет заметно влиять на диэлектрические свойства, измеряемые при другой частоте. Таким образом, измеряя зависящие от частоты диэлектрические свойства как функцию частоты *сильного* электрического поля, можно попытаться расшифровать внутримолекулярные электрические свойства, во многом аналогично тому, как в ЯМР-спектроскопии с помощью двумерных методов определяют так называемые J- и NOE-связности или перекрестные релаксационные связи ЯМР-активных ядер [42, 112, 127, 142, 224, 225]. Иными словами, исследуемую систему *возбуждают* на одной частоте (f_1) сильным полем напряженностью E_1 , а опрашивают на *других* частотах (f_2) (с полем E_{II}) либо одновременно ($t = 0$), либо позже ($t > 0$), причем f_1 , f_2 и t , а возможно, и E_1 и E_{II} предполагаются переменными. Какие же частоты имеет смысл рассматривать?

Можно ожидать, что многие наиболее интересные внутримолекулярные релаксационные процессы будут лежать в области частот, технически наиболее трудно достижимой, — выше 1 МГц, поскольку при более низких частотах в наблюдаемых спектрах, вероятно, доминирует просто вращение белка. Увеличение локальной вязкости растворителя, например при добавлении фосфолипидов, или химическое сшивание ферментных молекул на электродах будет способствовать понижению соответствующего частотного диапазона. Тем не менее при более низких частотах будет наблюдаться значительный вклад двойного слоя и фарадеевских электродных процессов. И хотя это не влияет на метод распознавания образа как таковой, по всей видимости отношение биоспецифический сигнал/шум для такого устройства будет тем больше, чем выше вклад динамики белка.

В настоящее время трудно точно определить особенности таких многомерных диэлектрических спектров, которые, вероятно, будут наиболее ценными с биоаналитической точки зрения. Нетрудно, однако, предсказать, что наилучшим способом нахождения лиганд-селективного сигнала, вероятно, является регистрация дифференциального спектра — (белок плюс лиганд) минус (белок). *In vivo* отклик биосенсорной системы является функцией либо заполнения, либо скорости заполнения исследуемого белкового рецептора. Ни в коем случае не умаляя технические трудности на этом пути, следует

признать, что если белки «узнают» лиганды и друг друга посредством таких частотно-зависимых электрических процессов, нет никаких *фундаментальных* причин, почему бы и нам не делать это так же.

Возможность помещения прибора, аналогичного рассмотренному выше, на электрофоретический гель с целью идентификации *белка* или нуклеиновой кислоты сама по себе представляется достаточным основанием для дальнейшей разработки этого принципа.

Благодарность

Автор благодарит Science and Engineering Research Council за финансовую поддержку, Кристин Харрис и профессора Гарета Морриса за полезные обсуждения, Энтони Паф за помощь в изготовлении фотографий и Сиэн Эванс за перепечатку рукописи.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Adey W. R.* Tissue interactions with nonionising electromagnetic fields. *Physiol. Rev.*, **61**, 435–514 (1981).
2. *Ahmed N., Natarajan T.* Discrete-time signals and systems. Reston Publishing, Reston, Virginia, USA 1983.
3. *Alder J. F., Fielden P. R., Clark A. J.* Simultaneous conductivity and permittivity detector with a single cell for liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **56**, 985–8 (1984).
4. *Anderson F. A., Jr.* Impedance plethysmography in the diagnosis of arterial and venous disease. *Ann. Biomed. Eng.*, **12**, 79–102 (1984).
5. *Archer W. I., Armstrong R. D.* The application of A. C. impedance methods to solid electrolytes. In *Electrochemistry* (ed. H. R. Thirsk), Vol. 7, pp. 157–202. Special Periodical Reports, The Chemical Society, London, 1980.
6. *Arwin H., Lundström I., Palmqvist A.* Electrode adsorption method for determination of enzymatic activity. *Med. Biol. Eng. Comput.*, **20**, 362–74 (1982).
7. *Asami K., Irimajiri A.* Dielectric dispersion of a single spherical bilayer membrane in suspension. *Biochim. Biophys. Acta*, **769**, 370–6 (1984).
8. *Asami K., Hanai T., Koizumi N.* Dielectric properties of yeast cells. *J. Membr. Biol.*, **28**, 169–180 (1976).
9. *Asami K., Koizumi N.* Dielectric approach to suspensions of ellipsoidal particles covered with a shell, in particular reference to biological cells. *Jap. J. Appl. Phys.*, **19**, 359–65 (1980).
10. *Asami K., Koizumi N.* Dielectric analysis of *Escherichia coli* in the light of the theory of interfacial polarisation. *Biophys. J.*, **31**, 215–28 (1980).
11. *Asami K., Irimajiri A., Hanai T., Shiraishi N., Utsumi K.* Dielectric analysis of mitochondria isolated from rat liver. I. Swollen mitoplasts as simulated by a singleshell model. *Biochim. Biophys. Acta*, **771**, 559–69 (1984).
12. *Athey T. W., Stuchly M. A., Stuchly S. S.* Dielectric properties of biological substances at radio frequencies. Part 1. Measurement method. *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, **MMT-30**, 82–6 (1982).
13. *Ballot C., Saizonou-Manika B., Mealet C., Favre-Bonvin G., Wallach J. M.* Conductimetric measurements of enzyme activities. *Anal. Chim. Acta*, **163**, 305–8 (1984).
14. *Bard A. J., Faulkner L. R.* *Electrochemical methods*. Wiley, Chichester, 1980.
15. *Becker R. O., Marino A. A.* *Electromagnetism and life*. State University of New York Press, Albany, 1982.
16. *Bendat J. S., Piersol A. G.* *Random data: analysis and measurement procedures*. Wiley-Interscience, New York, 1971.
17. *Bennett R. G., Calderwood J. H.* Experimental techniques in dielectric studies. In *Complex permittivity* (ed. B. K. P. Scaife), pp. 112–70. English University Press, London, 1971.
18. *Ben-Jakov S.* Electrochemical instrumentation. In *Marine electrochemistry* (eds. M. Whitfield, D. Jagner), pp. 99–122. Wiley, Chichester, 1981.
19. *Berne B. J., Pecora R.* *Dynamic light scattering*. Wiley-Interscience, New York, 1976.
20. *Besenhard J. O., Fritz H. P.* The electrochemistry of black carbons. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **22**, 950–75 (1983).
21. *Blackie G. G.* *Conductimetric analysis at radio frequency*. Chapman and Hall, London, 1950.

22. *Blake-Coleman B. C., Calder M. R., Carr R. J. G., Moody S. C., Clarke D. J.* Direct monitoring of reactor biomass in fermentation control. *Trends Anal. Chem.*, **3**, 229-35 (1984).
23. *Bleaney B. I., Bleaney B.* Electricity and magnetism (3rd edn). Oxford University Press, Oxford, 1976.
24. *Bloomfield P.* Fourier analysis of time series. An introduction. Wiley, New York, 1976.
25. *Bobrow L. S.* Elementary linear circuit analysis. Holt, Rinehart and Winston, New York, 1981.
26. *Bockris J. O'M., Reddy A. K. N.* Modern electrochemistry, Vols. 1 and 2. Plenum Press, New York, 1970.
27. *Bond A. M.* Modern polarographic methods in analytical chemistry. Marcel Dekker, New York, 1980.
28. *Boned C., Peyrelasse J.* Automatic measurement of complex permittivity (from 2 MHz to 8 GHz) using time-domain spectroscopy. *J. Phys. E. Sci. Instr.* **15**, 534-8 (1982).
29. *Box G. E. P., Jenkins G. M.* Time series analysis: forecasting and control. Revised Edition. Holden-Day, Oakland, California, (1976).
30. *Boyd R. H.* Dielectric constant and loss. In *Methods of experimental physics* (ed. R. A. Fava), Vol. 16C, pp. 379-421. Academic Press, New York, 1980.
31. *Bracewell R. N.* The Fourier transform and its applications (2nd edn). McGraw-Hill, Kogakusha, Tokyo, 1978.
32. *Breyer B., Bauer H.* Alternating current polarography and tensammetry. Wiley-Interscience, New York, 1963.
33. *Brown B. H.* Tissue impedance methods. In *Imaging with nonionizing radiations* (ed. D. F. Jackson), pp. 85-110. Surrey University Press, Guildford, 1983.
34. *Brown N. L.* An in situ salinometer for use in the deep ocean. In *Marine sciences instrumentation* (ed. F. Alt), Vol. 4, pp. 563-77 (1968).
35. *Brown P. B., France G. N., Moraff H.* Electronics for the modern scientist. Elsevier, Amsterdam, 1982.
36. *Bryant J.* The characterization of mixing in fermenters. *Adv. Biochem. Eng.*, **5**, 101-23 (1977).
37. *Bucholz R., Schügerl K.* Bubble column reactors. I. Methods for measuring the bubble size. *Eur. J. Appl. Microbiol. Technol.*, **6**, 301-13 (1979).
38. *Bucholz R.* Methods for measuring the bubble size in bubble column bioreactors. II. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 315-23 (1979).
39. *Buck R. P.* The impedance method applied to the investigation of ion-selective electrodes. *Ion-Selective Electrode Rev.*, **4**, 3-74 (1982).
40. *Burdette E. C., Cain F. L., Seals J.* In vivo probe measurement technique at VHF through microwave frequencies. *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, **MTT-28**, 414-27 (1980).
41. *Cady P.* Progress in impedance measurements in microbiology. In *Mechanizing microbiology* (eds. A. N. Sharpe, D. S. Clark), pp. 199-239. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1978.
42. *Campbell I. D., Dwek R. A.* Biological spectroscopy Benjamin-Cummings. London, 1984.
43. *Cartensen E. L., Marquis R. E.* Dielectric and electrochemical properties of bacterial cells. In *Spores VI* (eds. P. Gerhardt, R. N. Costilow, H. L. Sadoff), pp. 563-71. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1975.
44. *Champney D. C.* Fourier transforms and their physical applications. Academic Press, New York, 1973.
45. *Chatfield C.* The analysis of time series: an introduction (3rd edn). Chapman and Hall, London, 1984.
46. *Digital waveform processing and recognition.* Chen C. H. (ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, 1982.
47. *Nonlinear maximum entropy spectral analysis methods for signal recognition.* Chen C. H. (ed.). Research Studies Press, Chichester, 1982.
48. *Cheng D. K.* Field and wave electromagnetics. Addison-Wesley, London, 1983.
49. *Modern spectrum analysis.* Childers D. G. (ed.). IEEE Press, New York, 1978.
50. *Clarke D. J., Blake-Coleman B. C., Calder M. R., Carr R. J. G., Moody S. C.* Sensors for bioreactor monitoring and control a perspective. *J. Biotechnol.*, **1**, 135-58 (1984).
51. *Clarke D. J., Calder M. R., Carr R. J. C., Blake-Coleman B. C., Moody S. C.* The development and application of biosensing devices for bioreactor monitoring and control. *Biosensors J.*, **1**, 213-320 (1985).
52. *Clegg J. S., McClean V. E. R., Szwarnowski S., Sheppard R. J.* Microwave dielectric measurements (0.8-70 GHz) on *Artemia* cysts at variable water content. *Phys. Med. Biol.*, **29**, 1409-19 (1984).
53. *Clegg J. S., Szwarnowski S., McClean V. E. R., Sheppard R. J., Grant E. H.* Interrelationships between water and cell metabolism in *Artemia* cysts. X. Microwave dielectric studies. *Biochim. Biophys. Acta*, **721**, 458-68 (1982).
54. *Cole K. S.* Membranes, ions and impulses. University of California Press (1972).
55. *Cole R. H.* Evaluation of dielectric behaviour by time domain spectroscopy. I. Dielectric response by real time analysis. *J. Phys. Chem.*, **79**, 1459-69 (1975).
56. *Cole K. S., Cole R. H.* Dispersion and absorption in dielectrics. J. Alternating current characteristics. *J. Chem. Phys.*, **9**, 341-51 (1941).

57. Creason S. C., Hayes J. W., Smith D. E. Fourier transform faradaic admittance measurements. III. Comparison of measurement efficiency for various test signal waveforms. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **47**, 9-46 (1973).
58. Daniel V. V. Dielectric relaxation. Academic Press, London, 1967.
59. Davies M. Some electrical and optical aspects of molecular behaviour, pp. 96-7, Pergamon Press, Oxford, 1965.
60. Dawkins A. W. J., Sheppard R. J., Grant E. H. An outline computer-based system for performing time domain spectroscopy. I. Main features of the basic system. *J. Phys. E. Sci. Instrum.*, **12**, 1091-9 (1979).
61. De Felice L. J. Introduction to membrane noise. Plenum Press, New York, 1981.
62. De Haas M. P., Warman J. M. Photon-induced molecular charge separation studied by nanosecond time-resolved microwave conductivity. *Chem. Phys.*, **73**, 35-53 (1982).
63. Diamond J. M., Machen T. E. Impedance analysis in epithelia and the problem of gastric acid secretion. *J. Membr. Biol.*, **72**, 17-41 (1983).
64. Dow C. S., France A. D., Khan M. S., Johnson T. Particle size distribution analysis for the rapid detection of microbial infection of urine. *J. Clin. Pathol.*, **32**, 386-90 (1979).
65. Duffin W. J. Electricity and magnetism (3rd edn.). McGraw-Hill, London, 1980.
66. Dukhim S. S., Shilov V. N. Dielectric phenomena and the double layer in disperse systems and polyelectrolytes. Wiley, Chichester, 1974.
67. Eden J., Gascoyne P. R. C., Pethig R. Dielectric and electrical properties of hydrated bovine serum albumin. *JCS Faraday*, **1**, 76, 426-34 (1980).
68. Essex C. G., Symonds M. S., Sheppard R. J., Grant E. H., Lamotte R., Soetewey F., Rosseneu M. Y., Peeters H. Five-component dielectric dispersion in bovine serum albumin solution. *Phys. Med. Biol.*, **22**, 1160-7 (1977).
69. Falk G., Fatt P. Passive electrical properties of rod outer segments. *J. Physiol.*, **198**, 627-46 (1968).
70. Faure N., Flachet C., Jenin P., Lenoir J., Rouillet C., Thomasset A. Contribution à l'étude de la tendreté et de la maturation des viandes par la méthode de la conductibilité électrique en basse et haute fréquence. *Rev. Med. Vet.*, **123**, 1517-27 (1972).
71. Fernández J. M., Neher E., Gomperts B. D. Capacitance measurements reveal stepwise fusion events in degranulating mast cells. *Nature*, **312**, 453-5 (1984).
72. Ferris C. D. Introduction to bioelectrodes. Plenum Press, New York, 1974.
73. Fettiplace R., Gordon L. G. M., Hladky S. B., Requena J., Zingsheim H. R., Haydon D. A. Techniques in the formation and examination of 'black' lipid bilayer membranes. In *Methods of membrane biology* (ed. E. D. Korn), Vol. 4, pp. 1-75. Plenum Press, New York, 1975.
74. Firstenberg-Eden R., Eden G. Impedance microbiology. Research Studies Press, Letchworth, 1984.
75. Firstenberg-Eden R., Zindulis J. Electrochemical changes in media due to microbial growth. *J. Microbiol. Methods*, **2**, 103-15 (1984).
76. Foster K. R., Schepps J. L. Dielectric properties of tumor and normal tissues at radio through microwave frequencies. *J. Microwave Power*, **16**, 107-19 (1981).
77. Foster K. R., Epstein B. R. Microwave dielectric studies on proteins, tissues and heterogeneous suspensions. *Bioelectromagnetics*, **3**, 29-43 (1982).
78. Applications of pattern recognition. Fu K. S. (ed.). CRC Press, Boca Paton Florida, 1982.
79. Gabriel C., Sheppard R. J., Grant E. H. Dielectric properties of ocular tissue at 37°C. *Phys. Med. Biol.*, **28**, 43-49 (1983).
80. Gabrielli C. Identification of electrochemical processes by frequency response analysis. Solartron Electronic Group, Farnborough, 1980.
81. Gabrielli C., Keddam M. Progrès récent dans la mesure des impédances électrochimiques en régime sinusoïdal. *Electrochim. Acta*, **19**, 355-62 (1974).
82. Gabrielli C., Takenouti H. The use of A.C. techniques in the study of corrosion and passivity. In *Corrosion: aqueous processes and passive films. Treatise on materials science and technology* (ed. J. C. Scully), Vol. 23, pp. 395-451. Academic Press, New York, 1963.
83. Gabrielli C., Huet F., Keddam M., Lizee J. F. Measurement-time versus accuracy trade-off analysed for electrochemical impedance measurements by means of sine, white noise and step signals. *J. Electroanal. Chem.*, **138**, 201-8 (1982).
84. Geckinli N. C., Yavuz D. Discrete Fourier transformation and its applications to power spectra estimation. Elsevier, Amsterdam, 1983.
85. Geddes L. A. Electrodes and the measurement of bioelectric events. Wiley-Interscience, New York, 1972.
86. Gerber B. R., Routledge L. M., Takashima S. Self-assembly of bacterial flagellar protein: Dielectric behaviour of monomers and polymers. *J. Mol. Biol.*, **71**, 317-37 (1972).
87. Gerson D. F. The pressure fluctuation spectrum as a measure of mixing and emulsification in a biochemical reactor. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 59-72 (1980).
88. Grant E. H. The dielectric method of investigating bound water in biological material: an appraisal of the technique. *Bioelectromagnetics*, **3**, 17-24 (1982).

89. *Grant E. H.* Molecular interpretation of the dielectric behaviour of biological materials. In *Biological effects of dosimetry of nonionizing radiation* (eds. M. Gandolfo, S. M. Michaelson, A. Rindi), pp. 179–94. Plenum Press, New York, 1983.
90. *Grant E. H., South G. P.* Dielectric relaxation of proteins in aqueous solutions. *Adv. Mol. Rel. Proc.*, **3**, 355–77 (1972).
91. *Grant E. H., Sheppard R. J., South G. P.* Dielectric behaviour of biological molecules in solution. Oxford University Press, London, 1978.
92. *Hanai T., Haydon D. A., Taylor J.* An investigation by electrical methods of lecithin-in-hydrocarbon films in aqueous solutions. *Proc. R. Soc. Ser. A*, **281**, 377–91 (1964).
93. *Hanai T.* Polar group orientation and the electrical properties of lecithin biomolecular leaflets. *J. Theoret. Biol.*, **9**, 278–96 (1965).
94. *Harris C. M., Kell D. B.* The radio-frequency dielectric properties of yeast cells measured with a rapid, automated, frequency-domain dielectric spectrometer. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **11**, 15–28 (1983).
95. *Harris C. M.* On the dielectrically observable consequences of the diffusional motions of lipids and proteins in membranes. 2. Experiments with microbial cells, protoplasts and membrane vesicles. *Eur. Biophys. J.*, **13**, 11–24 (1985).
96. *Harris C. M.* The estimation of microbial biomass. *Biosensors J.*, **1**, 17–84 (1985).
97. *Harris C. M., Hitchens G. D., Kell D. B.* Dielectric spectroscopy of microbial membrane systems. In *Charge and field effects in biosystems* (eds. M. J. Allen, P. N. R. Usherwood), pp. 179–85. Abacus Press, Turnbridge Wells, UK, 1984.
98. *Hart F. X.* The use of time domain dielectric spectroscopy to characterize the progress of wound repair. *J. Bioelectricity*, **1**, 313–28 (1982).
99. *Harter J. H., Lin R. Y.* Essentials of electric circuits. Reston Publishing Company, Reston, Virginia, USA, 1982.
100. *Hasted J. B.* Aqueous dielectrics. Chapman and Hall, London, 1973.
101. *Hasted J. B., Husain S. K., Ko A. Y., Rosen D., Nicol E., Birch J. R.* Excitations of proteins by electric fields. In *Coherent excitations in biological systems* (eds. H. Frohlich, F. Kremer), pp. 71–83. Springer-Verlag, Heidelberg, 1983.
102. *Hause L. L., Komorowski R. A., Gayon F.* Electrode and electrolyte impedance in the detection of bacterial growth. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-28**, 403–10 (1981).
103. *Haydon D. A., Hendry B. M., Levinson S. R., Requena J.* Anaesthesia by the *n*-alkanes. A comparative study of nerve impulse blockage and the properties of black lipid bilayer membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **470**, 17–34 (1977).
104. *Henderson R. P., Webster J. G.* An impedance camera for spatially specific measurements of the thorax. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-25**, 250–54 (1978).
105. *Holler F. J., Enke C. G.* Conductivity and conductimetry. In *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry* (eds. P. T. Kissinger, W. R. Heineman), pp. 235–66. Marcel Dekker, New York, 1984.
106. *Hung B. N., Beard R. B., Brownstein M., Dubin S. E., Niazzy N., Miller A. J.* Correlation of linear A. C. polarization impedance studies with tissue in-growth for porous stimulating electrodes. In *Electrical properties of bone and cartilage* (eds. C. T. Brighton, J. Black, S. R. Pollack), pp. 249–66. Grune and Stratton, New York, 1979.
107. *Illinger K. H.* Electromagnetic-field interaction with biological systems in the microwave and far-infrared region. Physical basis. *ACS Symp. Ser.*, **157**, 1–46 (1981).
108. *Irimajiri A., Hanai T., Inouye S.* Evaluation of a conductometric method to determine the volume fraction of the suspensions of biomembrane-bounded particles. *Experientia*, **31**, 1373–4 (1975).
109. *Irimajiri A.* A dielectric theory of 'multi-stratified shell' model with its application to a lymphoma cell. *J. Theoret. Biol.*, **78**, 251–69 (1979).
110. *Jack J. J. B., Noble D., Tsien R. W.* Electric current flow in excitable cells. Clarendon Press, Oxford, 1975.
111. *Jakoubek B., Rohlicek V.* Changes of electrodermal properties in the 'acupuncture points' in men and rats. *Physiol. Bohem.*, **31**, 143–9 (1982).
112. *Jardetzky O., Roberts G. C. K.* Protein dynamics. In *NMR in molecular biology*, pp. 448–92. Academic Press, New York, 1981.
113. *Jenkins G. M., Watts D. G.* Spectral analysis and its applications. Holden-Day, Oakland, California, 1968.
114. *Jonscher A. K.* Physical basis of dielectric loss. *Nature*, **253**, 717–19 (1975).
115. *Kay S. M., Marple S. L.* Spectrum analysis—a modern perspective. *Proc. IEEE*, **69**, 1380–1419 (1981).
116. *Kell D. B.* Dielectric properties of bacterial chromatophores. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **11**, 405–15 (1983).
117. *Kell D. B., Harris C. M.* On the dielectrically observable consequences of the diffusional motions of lipids and proteins in membranes. I. Theory and overview. *Eur. Biophys. J.*, **12**, 181–97 (1985).

118. Kell D. B. Dielectric spectroscopy and membrane organisation. *J. Bioelectricity*, **4**, 317–48 (1985).
119. Kell D. B., Hitchens G. D. Coherent properties of the membranous systems of electron transport phosphorylation. In *Coherent excitations in biological systems* (eds. H. Fröhlich, F. Kremer), pp. 178–98. Springer-Verlag, Heidelberg, 1983.
120. Kell D. B., Westerhoff H. V. Catalytic facilitation and membrane bioenergetics. In *Organised multienzyme systems: catalytic properties* (ed. G. R. Welch), pp. 63–139. Academic Press, New York, 1985.
121. Keller G. V., Frischknecht F. C. *Electrical methods in geophysical prospecting*. Pergamon Press, Oxford, 1966.
122. Kent M. Time domain measurements of the dielectric properties of frozen fish. *J. Microwave Power*, **10**, 37–48 (1975).
123. Kent M., Jason A. C. Dielectric properties of food in relation to interactions between water and the substrate. In *Water relations of foods* (ed. R. B. Duckworth), pp. 211–231. Academic Press, London, 1975.
124. *Laboratory techniques in electro-analytical chemistry*. Kissinger P. T., Heineman W. R., eds. Marcel Dekker, New York, 1984.
125. Kraszewski A., Stuchly M. A., Stuchly S. S., Smith A. M. In vivo and in vitro dielectric properties of animal tissues at radio frequencies. *Bioelectromagnetics*, **3**, 421–32 (1982).
126. Kubitschek H. E. Counting and sizing microorganisms with the Coulter counter. In *Methods in microbiology* (eds. J. R. Norris, D. W. Ribbons), Vol. 1, pp. 593–610. Academic Press, London, 1969.
127. Kumar A., Wagner G., Ernst R. R., Wuthrich K. Studies of J-connectivities and selective ^1H - ^1H Overhauser effects in H_2O solutions of biological macromolecules by two-dimensional NMR experiments. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **96**, 1156–63 (1980).
128. Laver D. R., Smith J. R., Coster H. G. L. The thickness of the hydrophobic and polar regions of glycerol monooleate bilayers determined from the frequency dependence of bilayer capacitance. *Biochim. Biophys. Acta*, **772**, 1–9 (1984).
129. Lewis T. J. The dielectric behaviour of non-crystalline solids. *Diel. Rel. Mol. Proc.*, **3**, 186–218 (1977).
130. Lilly M. D. Problems in process scale-up. In *Bioactive microbial products 2; Development and production* (eds. L. J. Nisbet, D. J. Winstanley), pp. 79–89. Academic Press, London, 1983.
131. Lorrain P., Corson D. R. *Electromagnetism*. W. H. Freeman, San Francisco, 1979.
132. Loveland J. W. Conductometry and oscillatory. In *Treatise on analytical chemistry* (eds. I. M. Kolthoff, P. J. Elving), Vol. 4, pp. 2569–629. Interscience, New York, 1963.
133. Lovitt R. W., Walter R. P., Morris J. G., Kell D. B. Conductimetric assessment of the biomass content of immobilised (gel-entrapped) microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **23**, 168–73 (1986).
134. Lowe C. R. Biosensors. *Trends Biotechnol.*, **2**, 59–65 (1984).
135. Lowe C. R. An introduction to the concepts and technology of biosensors. *Biosensors*, **1**, 3–16 (1985).
136. Macdonald D. D. *Transient techniques in electrochemistry*. Plenum Press, New York, 1977.
137. Macdonald D. D., McKubre M. C. H. Impedance measurements in electrochemical systems. In *Modern aspects of electrochemistry* (eds. J. O'M. Bockris, B. E. Conway), Vol. 4, pp. 61–150. Plenum Press, New York, 1982.
138. Macdonald J. R. Interface effects in the electrical response of non-metallic conducting solids and liquids. *IEEE Trans. Electr. Insul.*, **EI-15**, 65–82 (1980).
139. Macdonald J. R., Schoonman J., Lehnen A. P. The applicability and power of complex non-linear least squares for the analysis of impedance and admittance data. *J. Electroanal. Chem.*, **131**, 77–95 (1982).
140. Mackey B. M., Derrick C. M. Conductance measurements of the lag phase of injured *Salmonella typhimurium*. *J. Appl. Bact.*, **57**, 299–308 (1984).
141. Magin R. L., Burdette E. C. Measurement of electrical properties of tissue at microwave frequencies: a new approach and treatment of abnormalities. In *Non-invasive measurements* (ed. P. Rolfe), Vol. 2, pp. 353–76. Academic Press, London, 1983.
142. Markley J. L., Westler W. W., Tze-Ming Chan, Kojiro C. L., Ulrich E. L. Two-dimensional NMR approaches to the study of protein structure and function. *Fed. Proc.*, **43**, 2648–56 (1984).
143. Marmarelis P. Z., Marmarelis V. Z. *Analysis of physiological systems. The white-noise approach*. Plenum Press, New York, 1978.
144. Marshall A. G. *Biophysical chemistry: principles, techniques and applications*. Wiley, New York, 1978.
145. Fourier, Hadamard and Hilbert transforms in chemistry. Marshall A. G. (ed.). Plenum Press, New York, 1982.
146. Marshall A. G. Transform techniques in chemistry. In *Physical methods in modern chemical analysis* (ed. T. Kuwana), Vol. 3, pp. 57–135. Academic Press, New York, 1983.
147. Marshall A. G., Roe D. C. Dispersion versus absorption: spectral line shape analysis for radio-frequency and microwave spectroscopy. *Anal. Chem.*, **50**, 756–63 (1978).
148. Martynov G. A., Salem R. R. Electrical double layer at a metal-dilute electrolyte solution interface. Springer-Verlag, Berlin, 1983.

149. *Mohilner D. M.* The electrical double layer. Part 1. Elements of double layer theory. In *Electroanalytical chemistry* (ed. A. J. Bard), Vol. 1, pp. 241–409. Edward Arnold, London, 1966.
150. *Mopsik F.* Precision time-domain dielectric spectrometer. *Rev. Sci. Instr.*, **55**, 79–87 (1984).
151. *Morse C. T.* A computer controlled apparatus for measuring AC properties of materials over the frequency range 10^{-5} to 10^5 Hz. *J. Phys. E. Sci. Instr.*, **7**, 657–62 (1974).
152. *Nakamura H., Hushimi Y., Wada A.* Time domain measurement of dielectric spectra of aqueous polyelectrolyte solutions at low frequencies. *J. Appl. Phys.*, **52**, 3053–61 (1981).
153. *Ngai K. L., Jonscher A. K., White C. T.* On the origin of the universal dielectric response in condensed matter. *Nature*, **277**, 185–9 (1979).
154. *Nyboer J.* *Electrical impedance plethysmography* (2nd edn.). Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1970.
155. *O'Brien R. W.* The response of a colloidal suspension to an alternating electrical field *Adv. Colloid. Interf. Sci.*, **16**, 281–320 (1982).
156. *Oncley J. L.* The electric moments and the relaxation times of proteins as measured from their influence upon the dielectric constants of solutions. In *Proteins, amino acids and peptides* (eds. E. J. Cohn, J. T. Edsall), pp. 543–568. Reinhold, New York, 1943.
157. *Osterhout W. J. V.* Injury, recovery and death, in relation to conductivity and permeability. J. B. Lippincott, Philadelphia and London, 1922.
158. *Pacela A. F.* Impedance pneumography—a survey of instrumentation techniques. *Med. Biol. Eng.*, **4**, 1–15 (1966).
159. *Pauly H.* Electrical properties of the cytoplasmic membrane and the cytoplasm of bacteria and of protozoa. *IRE Trans. Biomed. Electron.*, **9**, 93–95 (1962).
160. *Pauly H., Packer L.* The relationship of internal conductance and membrane capacity to mitochondrial volume. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**, 603–12 (1960).
161. *Pauly H., Schwan H. P.* Electrical properties of mitochondrial membranes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **7**, 589–601 (1960).
162. *Petersen D. C., Cone R. A.* The electric dipole moment of rhodopsin solubilised in Triton X-100. *Biophys. J.*, **15**, 1181–200 (1975).
163. *Pethig R.* *Dielectric and Electronic Properties of Biological Materials*. John Wiley, Chichester, 1979.
164. *Pethig R.* Dielectric properties of biological materials: biophysical and medical applications. *IEEE Trans. Electr. Insul.*, **EI-19**, 453–74 (1984).
165. *Pfutzner H., Fialik E.* A new electrophysical method for rapid detection of exudative porcine muscle. *Zbl. Vet. Med. A.*, **29**, 637–45 (1982).
166. *Phillips W. J.* Resonance effects in complex resistivity data and their significance in mineral exploration. *Trans. Inst. Min. Metall. (Sect. B. Appl. Earth. Sci.)*, **93**, B1–11 (1984).
167. *Pilla A. A.* Electrochemical information transfer at cell surfaces and junctions; applications to the study and manipulation of cell regulation. In *Bioelectrochemistry* (eds. H. Keyser, F. Gutmann), pp. 353–96. Plenum Press, New York, 1980.
168. *Pilla A. A., Sechaud P., McLeod B. R.* Electrochemical and electrical aspects of low-frequency electromagnetic current induction in biological systems. *J. Biol. Phys.*, **11**, 51–58 (1983).
169. *Pottel R., Gopel K.-D., Henze R., Kaatz U., Uhlendorf V.* The dielectric permittivity spectrum of aqueous colloidal phospholipid solutions between 1 kHz and 60 GHz. *Biophys. Chem.*, **19**, 233–44 (1984).
170. *Powley C. R., Nieman T. A.* Bipolar pulse conductometric monitoring of ion-selective electrodes. Part 4. Interferences from electroactive species in measurements with the calcium electrode. *Anal. Chim. Acta*, **155**, 1–9 (1983).
171. *Powley C. R., Geiger R. F., Jr., Nieman T. A.* Bipolar pulse conductance measurements with a calcium ion-selective electrode. *Anal. Chem.*, **52**, 705–9 (1980).
172. *Priestly M. B.* *Spectral analysis and time series*. 2 vols. Academic Press, New York, 1981.
173. *Pungor E.* *Conductometry and oscilometry*. Pergamon Press, Oxford, 1965.
174. *Randles J. E. B.* Kinetics of rapid electrode reactions. *Disc. Faraday Soc.*, **1**, 11–19 (1947).
175. *Redwood W. R., Takanshima S., Schwan H. P., Thompson T. L.* Dielectric studies on homogenous phosphatidylcholine vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **255**, 557–66 (1972).
176. *Reilly C. N.* High-frequency methods. In *New instrumental methods in electrochemistry* (ed. P. Delahay), pp. 319–345. Interscience, New York, 1954.
177. *Richards J. C. S., Jason A. C., Hobbs G., Gibson D. M., Christie R. H.* Electronic measurement of bacterial growth. *J. Phys. E. Sci. Instrum.*, **11**, 560–8 (1972).
178. *Salter D. C.* Quantifying skin disease and healing in vivo using electrical impedance measurements. In *Non-invasive physiological measurements* (ed. P. Rolfe), Vol. 1, pp. 21–64. Academic Press, London, 1979.
179. *Schanne O. F., Ceretti E. R. P.* *Impedance measurements in biological cells*. John Wiley, Chichester, 1978.

180. *Schmukler R., Pilla A. A.* A transient impedance approach to non-faradaic electrochemical kinetics at living cell membranes. *J. Electrochem. Soc.*, **129**, 526–8 (1982).
181. *Schügerl K.* On-line process analysis and control in biotechnology. *Trends Anal. Chem.*, **3**, 239–45 (1984).
182. *Schwan H. P.* Electrical properties of body tissues and impedance plethysmography. *IRE Trans. Biomed. Eng.*, **3**, 32–46 (1955).
183. *Schwan H. P.* Electrical properties of tissue and cell suspensions. In *Advances in biological and medical physics* (eds. J. H. Lawrence, C. A. Tobias), Vol. 5, pp. 147–209. Academic Press, New York, 1957.
184. *Schwan H. P.* Determination of biological impedances. In *Physical techniques in biological research* (ed. W. L. Nastuk), Vol. VIB, pp. 323–407. Academic Press, New York, 1963.
185. *Schwan H. P.* Alternating current electrode polarisation. *Biophysik*, **3**, 181–201 (1966).
186. *Schwan H. P.* Electrode polarisation impedance and measurements in biological materials. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **148**, 191–209 (1968).
187. *Schwan H. P.* Field interactions with biological matter. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **303**, 198–213 (1977).
188. *Schwan H. P.* Dielectric properties of biological tissue and biophysical mechanisms of electromagnetic field interactions. *ACS Symp. Ser.* **157**, 109–31 (1981).
189. *Schwan H. P.* Electrical properties of cells: Principles, some recent results, and some unresolved problems. In *The biophysical approach to excitable systems* (eds. W. J. Adelmann, Jr., D. E. Goldman), pp. 3–24. Plenum Press, New York, 1981.
190. *Schwan H. P.* Dielectric properties of biological tissue and Cells at RF- and MW-frequencies. In *Biological effects and dosimetry and non-ionizing radiation* (eds. M. Gandolfo, S. M. Michaelson, A. Rindi), pp. 195–211. Plenum Press, New York, 1983.
191. *Schwan H. P.* Dielectric properties of biological tissues and cells at ELF-frequencies. In *Biological effects and dosimetry of non-ionizing radiation* (eds. M. Gandolfo, S. M. Michaelson, A. Rindi), pp. 549–59. Plenum Press, New York, 1983.
192. *Schwan H. P., Ferris C. D.* Four-electrode null techniques for impedance measurement with high resolution. *Rev. Sci. Instr.*, **39**, 481–5 (1968).
193. *Schwan H. P., Foster K. R.* RF-field interactions with biological systems: electrical properties and biophysical mechanisms. *Proc. IEEE*, **68**, 104–13 (1980).
194. *Schwan H. R., Takashima S., Miyamoto V. K., Stoekenius W.* Electrical properties of phospholipid vesicles. *Biophys. J.*, **10**, 1102–19 (1970).
195. *Sekoguchi K., Takeishi M., Hironaga K., Nishiura T.* Velocity measurement with electrical double-sensing devices in two-phase flow. In *Measuring techniques in gas-liquid two-phase flows* (eds. J. M. Delahaye and G. Cognet), pp. 455–77. Springer-Verlag, Heidelberg, 1984.
196. *Shedlovsky T.* Conductometry. In *Physical methods of organic chemistry* (ed. A. Weissberger), Part 2, pp. 1651–83. Interscience, New York, 1949.
197. *Singh B., Smith C. W., Hughes R.* In vivo dielectric spectrometer. *Med. Biol. Eng. Comput.*, **17**, 45–60 (1979).
198. *Sluyters-Rehback M., Sluyters J. H.* Sine wave methods for the study of electrode processes. In *Electroanalytical chemistry* (ed. A. J. Bard), Vol. 4, pp. 1–128. Marcel Dekker, New York, 1970.
199. *Smith D. E. A. C.* polarography and related techniques; theory and practice. In *Electroanalytical chemistry* (ed. A. J. Bard), Vol. 1, pp. 1–155. Edward Arnold, London, 1966.
200. *Somogyi B., Welch G. R., Damjanovich S.* The dynamic basis of energy transduction in enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **768**, 81–112 (1984).
201. *Sorriso S., Surowiec A.* Molecular dynamics investigations of DNA by dielectric relaxation measurements. *Adv. Mol. Rel. Interaction Proc.*, **22**, 259–79 (1982).
202. *Sparnaay M. J.* The electrical double layer. Pergamon Press, Oxford, 1982.
203. *Steel M., Sheppard R. J., Grant E. H.* A precision method for measuring the complex permittivity of solid tissue in the frequency domain between 2 and 18 GHz. *J. Phys. E. Sci. Instrum.*, **17**, 29–34 (1984).
204. *Stewart G. N.* The relative volume or weight of corpuscles and plasma in blood. *J. Physiol.*, **24**, 356–73 (1899).
205. *Stewart G. N.* The changes produced by the growth of bacteria in the molecular concentration and electrical conductivity of culture media. *J. Exp. Med.*, **4**, 235–43 (1899).
206. *Stock J. T.* Two centuries of quantitative electrolytic conductivity. *Anal. Chem.*, **56**, 561A–70A (1984).
207. *Stoy R. D., Foster K. R., Schwan H. P.* Dielectric properties of mammalian tissue from 0.1 to 100 MHz: a summary of recent data. *Phys. Med. Biol.*, **27**, 501–13 (1982).
208. *Stuchly M. A., Stuchly S. S.* Coaxial line methods of measuring dielectric properties of biological substances at radio and microwave frequencies—a review. *IEEE Trans. Instrum. Meas.*, **IM-29**, 176–93 (1980).
209. *Stuchly M. A., Athey T. W., Stuchly S. S., Samaras G. M., Taylor G.* Dielectric properties of animal tissues in vivo at frequencies 10 MHz - 1 GHz. *Bioelectromagnetics*, **2**, 93–103 (1981).

210. Takashima S. Dielectric properties of proteins. I. Dielectric relaxation. In Physical principles and techniques of protein chemistry, Part A (ed. S. J. Leach), pp. 291–333. Academic, New York, 1969.
211. Takashima S., Minakata A. Dielectric behavior of biological macromolecules. In Digest of dielectric literature 37, pp. 602–53. National Research Council, Washington D. C., 1975.
212. Tamamushi R., Takahashi K. Instrumental study of electrolytic conductance using four-electrode cells. J. Electroanal. Chem., **50**, 277–84 (1974).
213. Thomas B. W., Pertel R. Measurement of capacity: analytical uses of the dielectric constant. In Treatise on analytical chemistry (eds. I. M. Kolthoff, P. J. Ewing), Vol. 4, pp. 2631–672. Interscience, New York, 1963.
214. Tien H. T. Bilayer lipid membranes (BLM). Theory and practice. Marcel Dekker, New York, 1974.
215. To E. C., Mudgett R. E., Wang D. I. C., Goldbluth S. A., Decareau R. V. Dielectric properties of food materials. J. Microwave Power, **9**, 303–15 (1974).
216. Turner G., Howell J. A. On-line estimation of the time constant of oxygen electrodes by time series analyses. Biotechnol. Lett., **6**, 215–20 (1984).
217. Vreudenhil Th., van der Touw F., Mandel M. Electric permittivity and dielectric dispersion of low molecular weight DNA of low ionic strength. Biophys. Chem., **10**, 67–80 (1979).
218. Wada A. The α -helix as an electric macrodipole. Adv. Biophys., **9**, 1–63 (1976).
219. The fluctuating enzyme. Welch G. R. (ed.). Wiley, New York, 1986.
220. Welch G. R., Kell D. B. Not just catalysis: the bioenergetics of molecular machines. In The fluctuating enzyme (ed. G. R. Welch), pp. 451–92. Wiley, New York, 1985.
221. Welch G. R., Somogyi B., Damjanovich S. The role of protein fluctuations in enzyme action: a review. Progr. Biophys. Mol. Biol., **39**, 109–46 (1982).
222. Wheeler H. B., Penney C. Impedance plethysmography: theoretical and experimental basis. In Non-invasive diagnostic techniques in vascular disease (ed. E. F. Bernstein), pp. 104–16. C. V. Mosby, St. Louis, 1982.
223. Wilson T. R. S. Conductometry. In Marine electrochemistry (eds. M. Whitfield, D. Jagner), pp. 145–85. Wiley, Chichester, 1981.
224. Winter F., Kimmich R. NMR field-cycling relaxation spectroscopy of bovine serum albumin, muscle tissue, *Micrococcus luteus* and yeast. $^{14}\text{N}^1\text{H}$ -quadrupole dipoles. Biochim. Biophys. Acta, **719**, 292–8 (1982).
225. Wuthrich K. Nuclear magnetic resonance studies of internal mobility in globular proteins. Biochem. Soc. Symp., **46**, 17–37 (1982).
226. Zimmerman U. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. Biochim. Biophys. Acta, **694**, 227–77 (1982).

Г. Сенсоры на основе кремниевых полупроводников

Глава 25

Микробиосенсоры на основе кремниевых транзисторов

Исао Карубе

25.1. Введение

В клиническом анализе чрезвычайно важны методы селективного определения органических соединений в биологических жидкостях, например в крови. В большинстве случаев органические соединения можно определять с помощью спектрофотометрии и каких-либо специфических катализируемых ферментами реакций. Соответствующие методики, однако, часто сложны и трудоемки и требуют значительного времени. В этом отношении от таких методик выгодно отличаются электрохимические сенсоры на основе иммобилизованных катализаторов. Действительно, ферментный сенсор обладает великолепной чувствительностью по отношению к биологическому субстрату; с его помощью можно определять конкретные соединения непосредственно в сложных смесях без предварительного разделения [1, 2]. Для того чтобы ферментный сенсор с успехом можно было применять в медицине, он должен быть достаточно миниатюрным. Миниатюризация сенсоров в сочетании с их высокой селективностью достигается путем использования полупроводниковых устройств и иммобилизованных ферментов.

В этой главе рассматриваются ионоселективные полевые транзисторы (ИСПТ) и микроэлектроды, применяющиеся в качестве микробиосенсорных преобразователей. Детально будут обсуждены устройство и характеристики микробиосенсоров для определения мочевины, АТФ (аденозинтрифосфата), глюкозы и глутамата; такие микробиосенсоры состоят из микропреобразователя и тонкой мембраны с иммобилизованным ферментом.

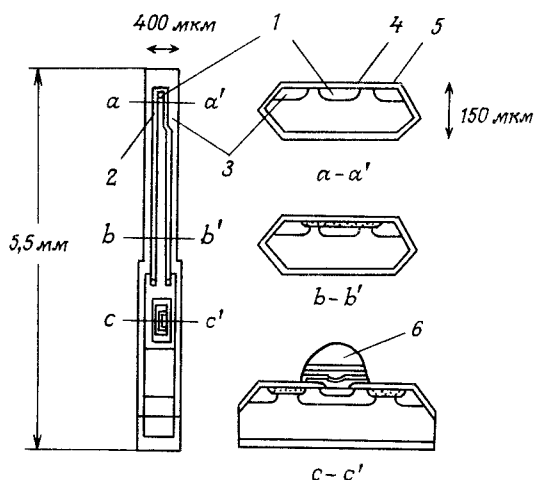
25.2. Сенсоры на основе полевых транзисторов

25.2.1. Микросенсор для определения мочевины

Ионоселективные полевые транзисторы (ИСПТ) впервые были описаны Бергвельдом в 1970 г. [3]. Мацуо и Уайз предложили усовершенствованную конструкцию ИСПТ, в которой в качестве диэлектрического затвора используется нитрид кремния (Si_3N_4), и использовали ее как сенсор pH [4]. В 1980 г. было показано, что ИСПТ с нанесенным на диэлектрический затвор слоем иммобилизованной пенициллиназы можно использовать как сенсор пенициллина [5] (см. гл. 26). Ферментный сенсор на основе ПТ описан и нами [6].

При оценке функции и состояния почек необходимо определять мочевину в крови и моче. Принятые спектрофотометрические методики анализа трудоемки и сложны. В этой связи представляется весьма целесообразной разработка недорогого миниатюрного сенсора, отличающегося высокой селективностью и чувствительностью и в то же время достаточно простого в работе. Все эти цели могут быть достигнуты с помощью преобразователя – ИСПТ.

Рис. 25.1. Схема ионоселективного полевого транзистора (ИСПТ). 1 – стоковая область; 2 – затвор; 3 – истоковая область; 4 – Si_3N_4 ; 5 – SiO_2 ; 6 – припой.



По данным Мацуо и Эсаши [7], изготовление ИСПТ включает практически те же операции, что и изготовление ПТ со структурой металл–диэлектрик–полупроводник (МДППТ). Конструкция ИСПТ представлена на рис. 25.1.

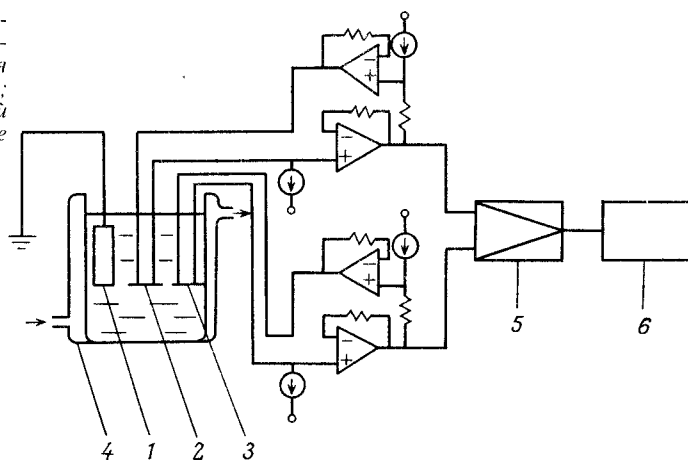
Диэлектрический затвор ИСПТ состоит из двух слоев; нижний представляет собой термически выращенный диоксид кремния (SiO_2), а верхний – нитрид кремния (Si_3N_4), чувствительный к ионам H^+ и затрудняющий проникновение ионов. Толщина слоев SiO_2 и Si_3N_4 равна приблизительно 0,1 мкм. Сенсорная система состоит из двух ИСПТ, на один из которых нанесен тонкий слой поливинилбутирала, сшитого поперечными связями и содержащего альдегидные группы; последние связываются с уреазой, образуя соединения типа оснований Шиффа, и таким образом иммобилизуется фермент (это чувствительный к мочеvine ферментный ИСПТ, ФПТ). Второй ИСПТ покрывают мембраной из сшитого поперечными связями поливинилбутирала (чувствительный только к рН стандартный ИСПТ, СПТТ).

Поливинилбутиральную мембрану наносят на затвор ИСПТ капельным методом. Для этой цели приблизительно 0,1 г поливинилбутирала и 1 мл 1,8-диамино-4-аминометилоктана растворяют в 10 мл дихлорметана. Полученный раствор полимера накапывают на диэлектрический затвор двух ИСПТ и затем последние погружают в 5%-ный раствор глутарового альдегида, в котором примерно через сутки при комнатной температуре завершается реакция образования поперечных связей. Уреазу иммобилизуют на ФПТ, помещая ИСПТ с поливинилбутиральную мембраной в раствор уреазы (5 мг/мл) приблизительно на сутки при 4°C .

Концентрацию мочевины измеряют, сравнивая выходное напряжение затворов ФПТ и СПТТ. Принципиальная электрическая схема системы представлена на рис. 25.2. Электрод сравнения (Ag/AgCl) помещают непосредственно в изучаемый раствор вместе с ФПТ и СПТТ, а напряжение затвора устанавливается между электродом сравнения и истоковой областью ФПТ и СПТТ. Поверхностный потенциал диэлектрика затвора, а следовательно, и выходное напряжение затвора зависят от рН раствора. Для оценки скорости достижения постоянного отклика системы к буферному раствору (5 мМ $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$) добавляли 100 мкл раствора мочевины и отклик системы (разность между выходным напряжением затворов ФПТ и СПТТ) измеряли в течение 10–20 мин.

Типичная кривая отклика сенсорной системы представлена на рис. 25.3. Нетрудно

Рис. 25.2. Принципиальная электрическая схема системы измерения. 1 – электрод сравнения (Ag/AgCl); 2 – ФПТ; 3 – СТПТ; 4 – ячейка; 5 – дифференциальный усилитель; 6 – регистрирующее устройство.



видеть, что дифференциальный отклик системы достигает постоянного значения примерно через 2 мин после добавления мочевины.

Для построения градуировочной кривой измеряли зависимость начальной скорости изменения разности выходных напряжений затворов от логарифма концентрации мочевины (см. рис. 25.4). Линейная зависимость наблюдалась в диапазоне концентраций мочевины от 1,3 до 16,7 мМ. Изучение селективности сенсорной системы показало, что на результаты не влияют глюкоза, креатинин и альбумин в концентрациях 6,3 мМ, 10 мМ и 3,6 мкМ соответственно.

Изучена и стабильность сенсорной системы для определения мочевины. Оказалось, что при 4°С ФПТ сохраняет способность реагировать на 16,7 мМ раствор мочевины в течение по меньшей мере двух недель.

25.2.2. Микросенсор для определения АТФ

Определение АТФ необходимо как в клинической практике, так и в ряде микробиологических производств. Существующие методы определения АТФ базируются на спектрофотометрии и измерении биoluminesценции. Соответствующие методики весьма сложны, поэтому возникла необходимость в создании более простого и дешевого метода анализа.

Фермент H^+ -АТРаза (ЕС 3.6.1.3) катализирует гидролиз или образование АТФ в биологических мембранах. Этот фермент выполняет и другие функции, в том числе транспорт протонов, который можно использовать в биомолекулярных устройствах.

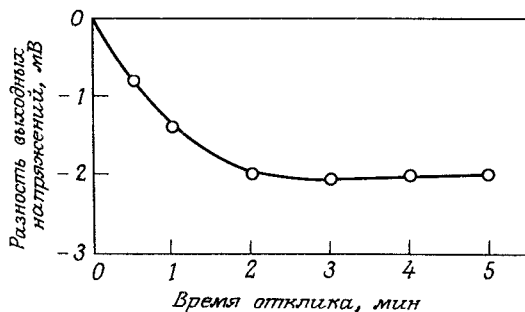


Рис. 25.3. Отклик сенсора на 1,7 мМ раствор мочевины (37°С, рН 7,0).

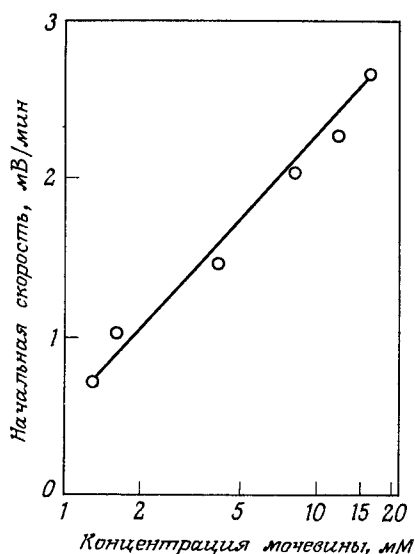


Рис. 25.4. Градуировочная кривая для определения мочевины (37°C , рН 7,0).

Свойства и функции фермента в биологических мембранах изучали Кагава и сотрудники [8, 9]. H^+ -АТФазу (точнее, термофильную АТФазу F_1) выделяли из термофильных бактерий PS3. По способу изготовления сенсоры для определения АТФ и мочевины принципиально не отличаются; одинаково измеряется и напряжение затвора. В качестве буферного раствора в сенсорной системе для определения АТФ применяли 50 мМ Трис-малеат при $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Разность выходного напряжения затворов достигала постоянного значения приблизительно через 4–5 мин после добавления АТФ.

Градуировочную кривую сенсорной системы для определения АТФ строили как зависимость начальной скорости изменения разности выходного напряжения затворов от логарифма концентрации АТФ (см. рис. 25.5). Линейная зависимость наблюдалась в диапазоне концентраций АТФ от 0,2 до 1,0 мМ.

Небольшой выходной сигнал в системе индуцировали 1 мМ растворы глюкозы, мочевины и креатинина. Система сохраняла способность реагировать на 1 мМ раствор АТФ в течение 19 дней.

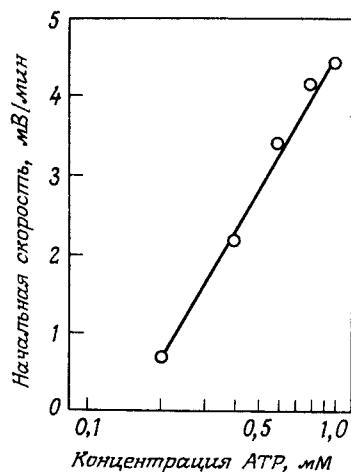


Рис. 25.5. Градуировочная кривая для определения АТФ (40°C , рН 7,0).

25.3. Микроэлектродные сенсоры

25.3.1. Сенсор глюкозы на основе микроэлектрода, чувствительного к пероксиду водорода

В медицинской практике часто возникает необходимость в определении глюкозы в пробах крови, поэтому создание соответствующих биоэлектрохимических устройств оказало бы большую помощь при выполнении обычных клинических анализов.

С другой стороны, в ряде областей медицины ощущается потребность в миниатюрных имплантируемых ферментных сенсорах на основе микропреобразователей. Для удовлетворения этих потребностей на базе технологии интегральных схем разработан микросенсор пероксида водорода (H_2O_2). Схема и основные элементы микросенсора H_2O_2 представлены на рис. 25.6. На поверхности нитрида кремния методом осаждения из паровой фазы сформированы золотые микроэлектроды; они частично изолированы слоем Ta_2O_5 . В изучаемый раствор, содержащий H_2O_2 , помещают H_2O_2 -электрод и устанавливают перенапряжение на уровне 1,1 В. Выходной ток сенсора немедленно возрастает и достигает постоянной величины через 1 мин. Линейная зависимость между концентрацией H_2O_2 и стационарным током наблюдается в диапазоне концентраций H_2O_2 от 1 мкМ до 1 мМ. Этот электрод затем использовали как преобразователь сигнала в микросенсоре для определения глюкозы. Глюкозооксидазу (GOD) иммобилизовали на электроде следующим образом. Поверхность электрода обрабатывали парами γ -аминопропилтриэтоксисилана (100 мкл, $80^\circ C$, 0,5 мм рт. ст., 30 мин), а затем парами 50%-ного глутарового альдегида в тех же условиях. Обработанные электроды погружали в раствор GOD, содержащий БСА и глутаровый альдегид; при этом GOD химически связывается с поверхностью электродов, образуя основания Шиффа с альдегидными группами. На рис. 25.7 представлено типичное изменение отклика микросенсора глюкозы во времени. После добавления раствора глюкозы выходной ток возрастает, достигая через 5 мин постоянной величины. На рис. 25.8 представлена градуировочная кривая для определения глюкозы с помощью описанного микросенсора.

Линейная зависимость между увеличением тока (разностью начального и стационарного значений) и концентрацией глюкозы наблюдается в диапазоне concentra-

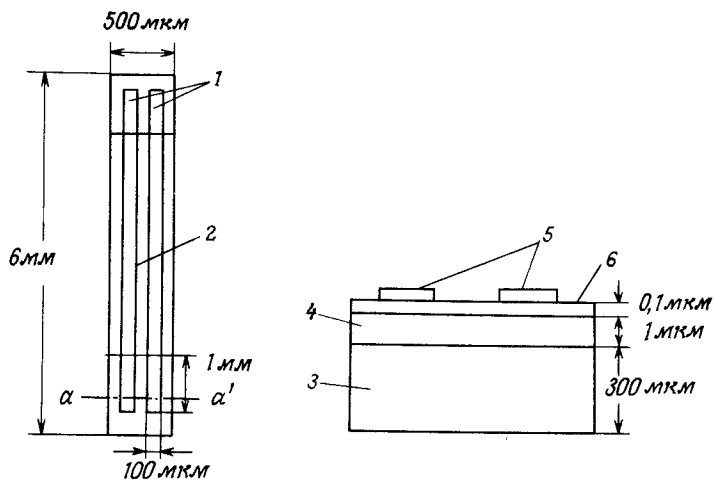


Рис. 25.6. Схема микроэлектрода. 1, 5 — золотые электроды; 2 — изолятор (Ta_2O_5); 3 — кремний; 4 — SiO_2 ; 6 — Si_3N_4 .

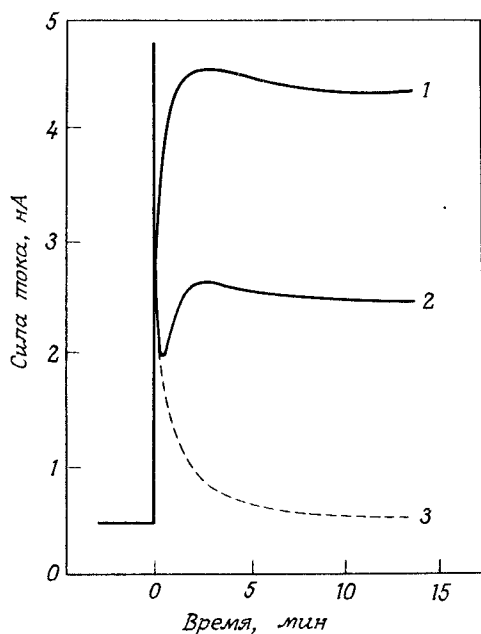


Рис. 25.7. Отклик сенсора на глюкозу (37°C , $\text{pH } 7,0$) при ее концентрации, мг/л : 1—1,0; 2—0,5; 3—в отсутствие глюкозы.

ций от 0,01 до 1,0 мг/л. Изучение селективности микросенсора показало, что он не дает отклика на такие соединения, как галактоза, манноза, фруктоза и мальтоза. Следовательно, этот сенсор глюкозы обладает вполне удовлетворительной селективностью.

На рис. 25.9 представлены данные о влиянии температуры на повышение тока в сенсорной системе. Оптимальная температура равна 55°C . В этих условиях, однако, стабильность работы сенсора низка, поскольку при 55°C фермент постепенно денатурирует. Поэтому все последующие эксперименты проводили при 37°C . Сенсор успешно эксплуатировали в течение 15 дней; за это время было выполнено 150 определений глюкозы, а сигнал при концентрации раствора 1 мг/л оставался постоянным. Эти данные свидетельствуют о хорошей селективности и стабильности сенсора, а следовательно, и о возможности его практического применения для определения глюкозы.

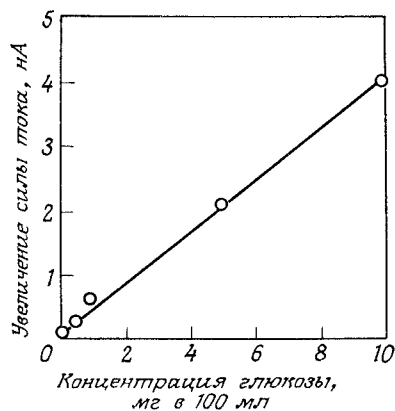
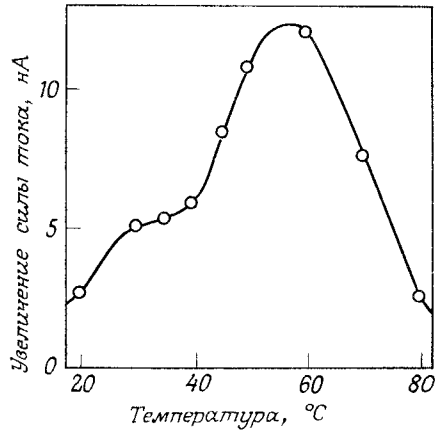


Рис. 25.8. Градуировочная кривая для определения глюкозы (37°C , $\text{pH } 7,0$).

Рис. 25.9. Влияние температуры на сигнал сенсора.



25.3.2. Сенсор глутамата на основе кислородного микроэлектрода

Определение L-глутаминовой кислоты (L-Glu) очень важно в пищевой промышленности, поскольку L-Glu, в больших количествах получаемая микробиологическим путем, широко применяется как вкусовая добавка к пищевым продуктам. Для микробиологической и пищевой промышленности разработано несколько глутаматных сенсоров, состоящих из иммобилизованного фермента и электрохимического устройства. Глутаматоксидаза катализирует окисление глутамата, причем в ходе окисления расходуется кислород. Следовательно, в качестве преобразователя сигналов глутаматного сенсора можно использовать кислородный сенсор. Такой кислородный микро-сенсор представляет собой модифицированный микроэлектрод для H_2O_2 (см. разд. 25.3.1).

Кислородный микросенсор схематично изображен на рис. 25.10. Он состоит из газопроницаемой тефлоновой мембраны, двух золотых микроэлектродов и раствора электролита (0,1 М KOH). Характеристики кислородного микроэлектрода изучали с помощью циклической вольтамперометрии при различных концентрациях растворенного кислорода (смесь кислорода и азота барботировали через изучаемый раствор). Если к золотым электродам приложено напряжение около 1,1 В, то наблюдается пик тока, что связано с восстановлением кислорода. Между определяемым таким путем током пика и концентрацией кислорода существует линейная зависимость (см. рис. 25.11). Отсюда следует, что кислородные микроэлектроды можно применять для определения концентрации кислорода, а также в качестве преобразователей сигнала в сочетании с микросенсорами для определения глутамата.

Глутаматоксидазу иммобилизовали на триацетилцеллюлозной мембране, содержащей глутаровый альдегид и триамин (1,8-диамино-4-аминометилотан). Мембрану с

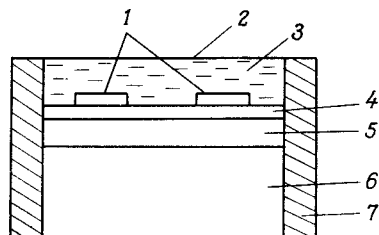


Рис. 25.10. Схема кислородного электрода. 1 — золотые электроды; 2 — тефлоновая мембрана; 3 — 0,1 М KOH; 4 — Si_3N_4 ; 5 — SiO_2 ; 6 — кремний; 7 — силиконовый каучук.

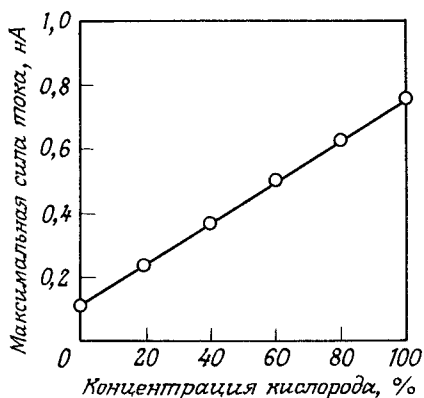


Рис. 25.11. Градуировочная кривая кислородного электрода. Диапазон изменения потенциала от $-1,25$ до 1 В; скорость развертки 100 мВ^{-1} .

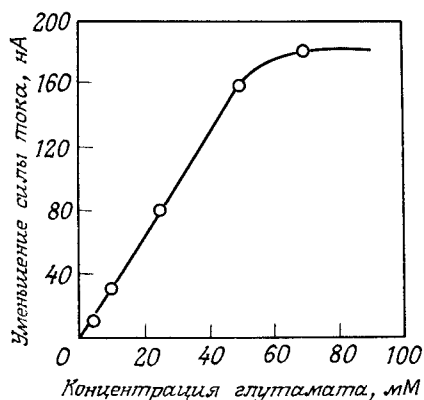


Рис. 25.12. Градуировочная кривая микросенсора для определения глутамата (40°C , рН 7,5).

глутаматоксидазой помещали на тефлоновую мембрану кислородного микросенсора и защищали нейлоновой сеткой. При контакте этой сложной сенсорной системы с раствором глутамата в результате окисления последнего наблюдается быстрое уменьшение выходного тока до некоторого стационарного значения.

На рис. 25.12 представлен график зависимости уменьшения тока от концентрации глутамата. Если в качестве меры активности взять уменьшение тока через 5 мин после добавления раствора глутамата, то между уменьшением тока и концентрацией глутаминовой кислоты наблюдается линейная зависимость в диапазоне концентраций от 5 до 50 мМ. Изучено влияние температуры на уменьшение тока пика сенсора. Оптимальная температура оказалась равной приблизительно 40°C , но в этих условиях постепенная денатурация фермента приводит к снижению стабильности работы сенсора. Поэтому все последующие эксперименты проводили при 30°C .

Селективность сенсора для определения глутамата оказалась вполне удовлетворительной, и его применение для контроля микробиологических процессов и анализа пищевых продуктов представляется весьма целесообразным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Karube I., Suzuki S., Amperometric and potentiometric determinations with immobilized enzymes and micro-organisms. *Ion-Selective Electrode. Review*, 6, 15–58 (1984).
2. Karube I., Suzuki S., Immobilized enzymes for clinical analysis. In *Enzymes and immobilized cells in biotechnology* (Laskin A. I., ed.), pp. 209–26. Benjamin/Cumming Publishing, London, 1985.

3. *Bergveld P.*, Development of an ion-sensitive solid-state device for neuro-physiological measurements. *IEEE Trans. on BME*, **BME-17**, 70-1 (1970).
4. *Matsuo T., Wise K.D.* An integrated field-effect electrode for biopotential. *IEEE Trans. on BME*, **BME-21**, 485-7 (1974).
5. *Caras S., Janata J.* Field effect transistor sensitive to penicillin. *Anal. Chem.*, **52**, 1935-7 (1980).
6. *Miyahara Y., Matsu F., Moriizumi T., Matsuoka H., Karube I., Suzuki S.* Micro enzyme sensors using semiconductor and enzyme-immobilization techniques. In *Proceedings of the international meeting on chemical sensors*, Kodansha, Tokyo, pp. 501-6. Elsevier, New York, 1983.
7. *Matsuo T., Esashi M.* Methods of ISFET fabrication. *Sensors and Actuators*, **1**, 77-96 (1981).
8. *Kagawa Y.* A new model of proton motive ATP synthesis: acid-base cluster hypothesis. *J. Biochem.* **95**, 295-98 (1984).
9. *Yoshida M., Sone N., Hirata H., Kagawa Y.* Reconstitution of adenosine triphosphatase of thermophilic bacterium from purified individual subunits. *J. Biol. Chem.*, **252**, 3480-5 (1977).

Глава 26

Химически чувствительные полевые транзисторы

Гэри Ф. Блэбберн

26.1. Введение

Химически чувствительные полевые транзисторы (ХЧПТ) появились в результате слияния двух хорошо разработанных технологий – интегральных схем (ИС) и ионоселективных электродов (ИСЭ). Впервые ХЧПТ описан Бергвельдом [11]; в нем для придания чувствительности к ионам водорода на полевой транзистор с диэлектрическим затвором (ДЗПТ) был нанесен слой диоксида кремния. За прошедшее с тех пор время были достигнуты значительные успехи, особенно в области ионоселективных полевых транзисторов (ИСПТ). Разработанные ранее для ИСЭ ионоселективные мембраны, как оказалось, можно применять и в производстве ИСПТ, что существенно облегчило создание последних. Значительные усилия прилагались и для разработки сенсоров типа ХЧПТ, селективных по отношению к неионным соединениям, однако все же по степени развития эта область уступает ИСПТ.

При написании этой главы авторы не стремились охватить все опубликованные данные. Основное внимание здесь будет уделено обсуждению наиболее активно развивающихся в настоящее время направлений. Читателям, особо интересующимся проблемой ХЧПТ, рекомендуется ознакомиться с более подробными сведениями в монографиях [1] или [2].

26.2. Теория химических сенсоров на основе полевых транзисторов

Чтобы понять, как функционирует химически чувствительный полевой транзистор, сначала необходимо ознакомиться с физическими процессами, происходящими в полевом транзисторе с диэлектрическим затвором, на базе которого и были созданы ХЧПТ. Сначала мы рассмотрим с качественной точки зрения электронные свойства полупроводниковых материалов, а затем транзисторы со структурой металл-диэлектрик-полупроводник (МДП), являющиеся предшественниками ДЗПТ. Теорию ДЗПТ легко распространить и на описание ХЧПТ. Подробное и строгое описание физики полупроводников не входит в цели этой книги и не обязательно для того, чтобы понять, как работают ХЧПТ. Интересующийся читатель может подробнее ознакомиться с физикой полупроводниковых устройств в монографиях [3] или [4].

Важно отметить, что полевые транзисторы со структурами металл-оксид-полупроводник (МОПТ), металл-диэлектрик-полупроводник (МДПТ) и металл-нитрид-оксид-полупроводник (МНОПТ) представляют собой различные варианты ДЗПТ.

26.2.1. Физика полупроводников

Чтобы понять физику полупроводниковых материалов в том объеме, в каком это необходимо для обсуждения принципа действия ДЗПТ или ХЧПТ, целесообразно прежде всего обратиться к диаграммам энергетических зон полупроводников. На

Рис. 26.1. Диаграмма энергетических зон нелегированного кремния.

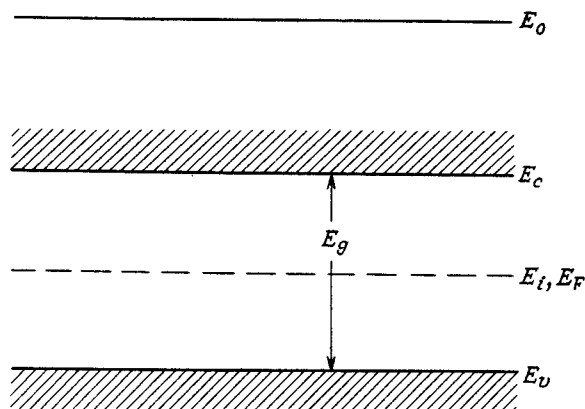


рис. 26.1 представлена диаграмма энергетических зон кремния. Чем выше на диаграмме расположена зона, тем больше энергия находящихся в этой зоне электронов. Ось абсцисс отражает расстояние в кремнии. Заштрихованные области — это разрешенные для электронов кремния энергетические уровни. Верхняя зона называется зоной проводимости; ее низший энергетический уровень обозначают символом E_c . Нижняя зона является валентной зоной кремния; ее высший энергетический уровень обычно обозначают символом E_v . Все энергетические уровни отнесены к «уровню вакуума» E_0 , под которым понимают энергию электрона, свободного от влияния данного материала. Область энергий между E_c и E_v называют «запрещенной» энергетической зоной; в ней нет разрешенных электронных уровней. Разность между E_c и E_v называют шириной энергетической щели и обозначают символом E_g ; для кремния $E_g = 1,1$ эВ. При температуре абсолютного нуля (0 К) все разрешенные энергетические уровни валентной зоны заполнены электронами, а все уровни в зоне проводимости свободны. Даже при комнатной температуре (300 К) средняя кинетическая энергия электронов равна всего лишь 0,04 эВ, т. е. менее 4% ширины энергетической щели. По этой причине и число электронов, энергия которых достаточна для перехода в зону проводимости, в таких условиях чрезвычайно мало.

Электронная электропроводность возникает тогда, когда электроны полупроводника движутся под воздействием любого электрического поля. Если электроны движутся, то их кинетическая энергия увеличивается; в результате они переходят на свободный более высокий энергетический уровень. Электропроводность чистого (нелегированного) кремния (собственная электропроводность) очень мала, поскольку все валентные энергетические уровни уже заполнены и свободных уровней, необходимых для электронов с повышенной кинетической энергией, нет. В зоне проводимости имеется множество свободных энергетических уровней, но число электронов на них ничтожно мало, поэтому и собственная электропроводность кремния при комнатной температуре чрезвычайно низка.

Придать электропроводность кремнию можно, введя в его кристалл атомы другого элемента. Кремний превращается в полупроводник *n*-типа, если кристалл легирован атомами элементов V группы периодической таблицы, например фосфора или мышьяка. У последних число валентных электронов больше, чем у атомов кремния, поэтому при включении в решетку кристалла они отдают электроны кристаллу. Как показано на диаграмме энергетических зон (см. рис. 26.2, а), энергетический уровень электронов легирующего элемента E_d лежит в запрещенной зоне вблизи зоны проводимости. При комнатной температуре энергия большинства электронов донорного уровня E_d доста-

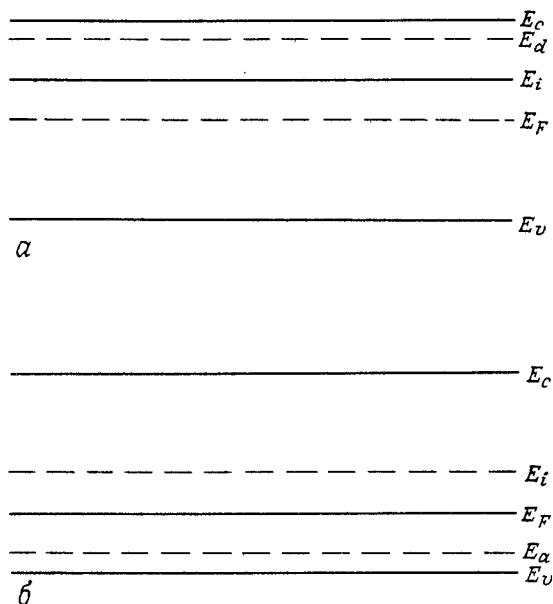


Рис. 26.2. Диаграмма энергетических зон легированного кремния. *a*: полупроводник *n*-типа; *b*: полупроводник *p*-типа.

точно для того, чтобы они смогли перейти в зону проводимости. Увеличение концентрации электронов сопровождается повышением электропроводности кремния.

Если же кристалл кремния легировать элементами III группы периодической таблицы, например бором или алюминием, то кремний превращается в полупроводник *p*-типа. У атомов этих элементов на один валентный электрон меньше, чем у атомов кремния, поэтому они создают неподвижные «ловушки», захватывающие свободные электроны. Как показано на рис. 26.2, *b*, энергетический уровень электронов легирующего элемента E_α близок к валентной зоне кремния. Энергия большинства электронов валентной зоны достаточна для их перехода на акцепторные уровни E_α , и таким образом эти уровни целиком заполняются. Каждый валентный электрон, перешедший на один из акцепторных уровней E_α , оставляет после себя «дырку», т. е. свободный разрешенный уровень валентной зоны, на который может перейти оставшийся в этой зоне другой электрон. Таким образом под воздействием электрического поля эти электроны приобретают дополнительную кинетическую энергию и способствуют повышению электропроводности кремния *p*-типа.

Уровнем Ферми E_F полупроводника называют такой энергетический уровень, вероятность нахождения электрона на котором равна 1/2. В чистом кремнии (см. рис. 26.1) уровень Ферми находится посередине между зоной проводимости и валентной зоной; в этом случае его называют собственным уровнем E_i . В кремнии *n*-типа (см. рис. 26.2, *a*) уровень Ферми ближе к зоне проводимости, поскольку число электронов на уровнях выше E_i больше, чем в чистом кремнии. В кремнии *p*-типа наблюдается обратная картина (см. рис. 26.2, *b*). Здесь уровень E_F расположен ниже E_i и ближе к валентной зоне. Точное положение E_F в запрещенной зоне зависит от концентрации легирующего элемента, и при повышении последней разность энергий между E_F и E_i возрастает в кремнии как *n*-, так и *p*-типа.

Теперь, получив представление об энергетических зонах в полупроводниковых материалах, можно перейти к обсуждению принципов работы полупроводниковых устройств (например, ДЗПТ и ХЧПТ).

26.2.2. Структура металл–диэлектрик–полупроводник

Начать знакомство с физикой ДЗПТ лучше всего с транзисторов со структурой металл–диэлектрик–полупроводник (МДП). Такие транзисторы состоят из металлического электрода, полупроводника и разделяющего их тонкого (например, толщиной 100 нм) слоя диэлектрика, такого, как диоксид кремния (SiO_2). Будем считать, что этот диэлектрик абсолютно не проводит электрический ток. Для упрощения обсуждения допустим также, что транзистор со структурой МДП обладает следующими «идеальными» характеристиками: 1) работа выхода электронов в металле Φ_m равна работе выхода электронов в полупроводнике Φ_s ; 2) в диэлектрике отсутствует результирующий заряд; 3) в диэлектрике нет подвижных заряженных частиц; 4) на границе раздела между полупроводником и диэлектриком нет никаких особых поверхностных состояний. Анализ структуры МДП включает оценку распределения заряда и потенциала в зависимости от разности потенциалов между металлом и полупроводником. Завершив анализ «идеальной» структуры МДП, легко перейти к анализу аналогичных неидеальных структур.

На рис. 26.3 представлена диаграмма энергетических зон идеальной структуры МДП в отсутствие разности потенциалов. Допустим, что полупроводником является кремний с акцепторной примесью, т.е. кремний p -типа. Обозначим энергетический барьер переноса электронов через диэлектрик символом $q\phi_B$. Как показано на рисунке, в состоянии равновесия уровни Ферми металла и кремния совпадают, а потенциал и распределение заряда везде постоянны. Если же к металлу приложить напряжение, а кремний заземлить, то система выйдет из равновесного состояния и уровни Ферми металла и кремния разделятся, причем разность между ними будет пропорциональна приложенному напряжению. Система становится, таким образом, своеобразным заряженным конденсатором, заряженными пластинами которого являются металл и полупроводник.

Если к металлу приложен отрицательный потенциал, а кремний заземлен, то создающееся электрическое поле будет притягивать положительно заряженные дырки в кремнии к границе раздела кремний–диэлектрик, а электроны металла – к границе металл–диэлектрик. На рис. 26.4, а представлена диаграмма энергетических зон такого состояния, известного под названием «накопление». Символами (+) вблизи валентной зоны обозначены накопленные на границе раздела кремний–диэлектрик дырки. Обратите внимание на то, что, поскольку на диаграммах более высокоэнергетические электроны принято располагать выше, уровень Ферми металла оказывается выше уровня Ферми кремния, несмотря на более низкую энергию электронов металла. Здесь

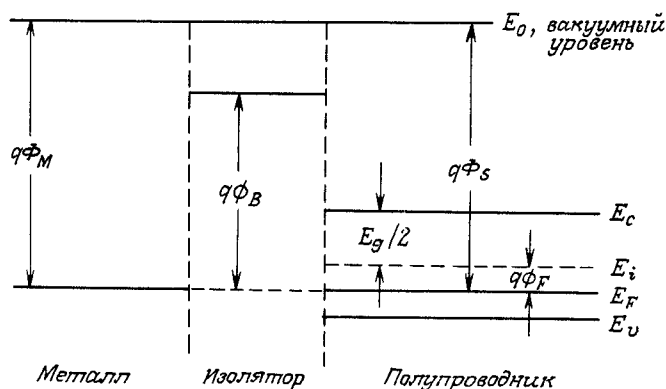


Рис. 26.3. Диаграмма энергетических зон идеальной структуры металл–диэлектрик–полупроводник в отсутствие разности потенциалов.

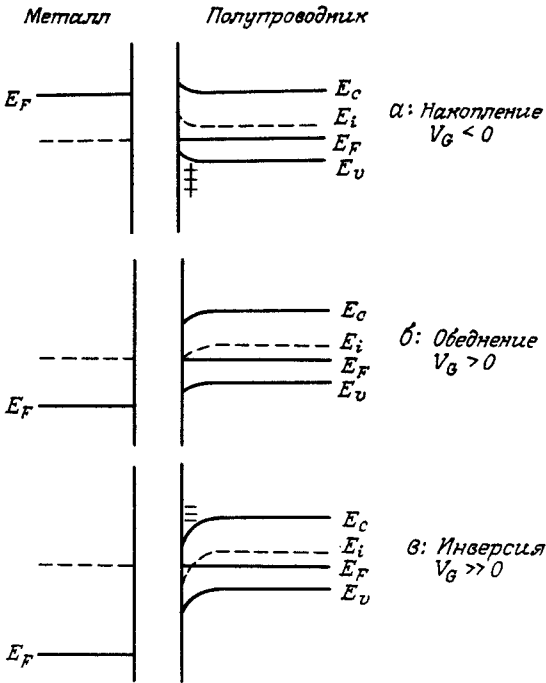


Рис. 26.4. Диаграмма энергетических зон структуры МДП в состоянии накопления (а), обеднения (б) и инверсии (в).

целесообразно рассмотреть также форму энергетических зон на диаграмме. Отрицательный потенциал резко снижает концентрацию дырок на границе раздела кремний-диэлектрик; следовательно, на последней уровень Ферми должен сдвигаться ближе к валентной зоне. Поскольку в кремнии носители зарядов находятся в тепловом равновесии (в противном случае возник бы электрический ток, который опять-таки привел бы к равновесию), то уровень Ферми в кремнии должен быть плоским; следовательно, валентная зона должна искривляться в сторону уровня Ферми. Поскольку для данного материала разность E_g энергий между валентной зоной и зоной проводимости постоянна, то вблизи границы раздела зона проводимости также должна искривиться. Аналогично, поскольку собственный уровень Ферми располагается посередине между зоной проводимости и валентной зоной, то вблизи границы раздела он также должен отклониться вверх. В металле в силу высокой концентрации электронов и большой плотности свободных энергетических уровней уровень Ферми остается постоянным вплоть до самой границы раздела.

Если к металлу приложен небольшой положительный потенциал (относительно полупроводника), то электрическое поле смещает подвижные носители положительного заряда (дырки) от границы раздела кремний-диэлектрик; это явление называют обеднением. Поскольку концентрация дырок в кремнии вблизи границы раздела уменьшена, то уровень Ферми должен сместиться дальше от валентной зоны. Таким образом, как это показано на рис. 26.4, б, вблизи границы раздела энергетические зоны смещаются вниз. Возникающая область обеднения будет иметь отрицательный результирующий заряд, поскольку отрицательно заряженные легирующие атомы не могут двигаться в электрическом поле.

Если величина положительного потенциала на металле возрастет, то вблизи границы раздела энергетические зоны отклонятся вниз в еще большей степени. Как

показано на рис. 26.4, в, при некоторой величине потенциала собственный уровень E_i опустится ниже уровня Ферми E_F . В точке, где уровень Ферми и собственный уровень равны, концентрации дырок и электронов также будут равны. Если же уровень Ферми опустится ниже собственного уровня, то вблизи границы раздела концентрация электронов превысит концентрацию дырок, и в этой области кремний p -типа превратится в кремний n -типа. Такое явление обычно называют инверсией, а тонкий слой кремния n -типа — инверсионным слоем. На рис. 26.4, в символами $(-)$ обозначены электроны в инверсионном слое.

На рис. 26.3 разность потенциалов, вызывающая инверсию (т. е. отклонение собственного уровня до уровня Ферми), обозначена как ϕ_F . В последующем анализе ДЗПТ более полезным будет понятие о «сильной инверсии», соответствующей смещению зон на границе раздела на $2q\phi_F$. Поскольку между плотностью электронов на границе раздела и величиной $(E_i - E_F)$ существует экспоненциальная зависимость, то после точки сильной инверсии плотность электронов в инверсионном слое возрастает чрезвычайно быстро. По этой же причине, если разность потенциалов превышает необходимую для сильной инверсии, дальнейшее смещение зон будет незначительным. Обычно разность потенциалов между металлом и кремнием, вызывающую сильную инверсию, называют пороговым напряжением V_T . Оно задается уравнением

$$V_T = -\frac{Q_B}{C_0} + 2\phi_F. \quad (26.1)$$

Здесь Q_B — заряд единицы площади поверхности области объемного заряда, C_0 — емкость единицы поверхности диэлектрика. В правой части уравнения первый член описывает падение напряжения на диэлектрике, а второй — на поверхности кремния.

Уравнение (26.1) справедливо только в случае идеальных структур МДП, которые мы и рассматривали выше. Отклонения от идеального поведения обычно приводят к смещению зон даже в отсутствие разности потенциалов между металлом и диэлектриком. Ниже такие эффекты рассматриваются индивидуально; в каждом случае пороговому напряжению будет дано модифицированное определение. Так, если в силу данного эффекта при нулевой разности потенциалов энергетические зоны отклоняются вверх, то состояние сильной инверсии будет достигаться при большем V_T .

Если разность Φ_{ms} между работами выхода электронов в металле и полупроводнике не равна нулю, то при нулевой разности потенциалов металл и полупроводник не будут находиться в состоянии теплового равновесия, если только электроны не будут двигаться от материала с меньшей работой выхода к материалу с большей работой выхода. В отличие от идеальной системы это приведет к отклонению энергетических зон при нулевой разности потенциалов. Чтобы зоны вновь стали «плоскими», необходимо приложить разность потенциалов, уравновешивающую разность между работами выхода двух материалов. Следовательно, пороговое напряжение возрастет на величину Φ_{ms} :

$$V_T = \Phi_{ms} - \frac{Q_B}{C_0} + 2\phi_F. \quad (26.2)$$

Аналогично учитывают отличный от нуля заряд диэлектрика. Такой заряд индуцирует зеркальные заряды как в металле, так и в полупроводнике и опять-таки приводит к отклонению энергетических зон при нулевой разности потенциалов. С учетом отличного от нуля заряда диэлектрика пороговое напряжение равно [3]:

$$V_T = \Phi_{ms} - \frac{1}{C_0} \int_0^d \rho(x) dx - \frac{Q_B}{C_0} + 2\phi_F. \quad (26.3)$$

Здесь x – расстояние от границы раздела металл–диэлектрик; $\rho(x)$ – плотность заряда как функция x ; d – толщина слоя диэлектрика.

Помимо зарядов, располагающихся по всей толщине диэлектрика, в последнем имеется слой зарядов вблизи границы раздела, особенно при $x = d$. Обычно такой слой рассматривают независимо от распределенного в диэлектрике заряда и обозначают символом Q_{ss} (заряд на единицу поверхности). С учетом поверхностного заряда пороговое напряжение равно

$$V_T = \Phi_{ms} - \frac{1}{C_0} \int_0^d x \rho(x) dx - \frac{Q_{ss}}{C_0} - \frac{Q_B}{C_0} + 2\phi_F. \quad (26.4)$$

Наконец, необходимо рассмотреть и такие отклонения от идеального поведения, которые могут быть вызваны нарушением периодичности структуры решетки кремниевого кристалла на границе раздела кремний–диэлектрик. Нарушение структуры решетки на границе раздела приводит к почти непрерывному распределению разрешенных энергетических уровней, называемых в этом случае «поверхностными состояниями», внутри запрещенной зоны. Анализ влияния поверхностных состояний сложен и детально рассмотрен в других работах, например в монографии [4]. К счастью, применяющиеся в настоящее время при производстве транзисторов со структурой МДП операции отжига снижают число поверхностных состояний до такого уровня, когда их влияние становится пренебрежимо малым, по крайней мере в системе кремний–диоксид кремния. По этой причине мы не будем далее учитывать поверхностные состояния.

Удобно объединить три члена уравнения для порогового напряжения (26.4), описывающие отклонения системы от идеального поведения, в один член V_{FB} , называемый напряжением, соответствующим плоским энергетическим зонам. Иными словами, V_{FB} – это такое напряжение, которое надо приложить к металлу, чтобы энергетические зоны стали плоскими (т. е. соответствовали идеальному поведению системы). Отсюда

$$V_T = V_{FB} + 2\phi_F - \frac{Q_B}{C_0}, \quad (26.5)$$

где

$$V_{FB} = \Phi_{ms} - \frac{Q_{ss}}{C_0} - \frac{1}{C_0} \int_0^d x \rho(x) dx. \quad (26.6)$$

Уравнения (26.5) и (26.6) определяют напряжение, которое необходимо приложить к структуре МДП, чтобы вызвать сильную инверсию. Эти уравнения важны и в физике ДЗПТ, которые, по сути дела, представляют собой транзистор со структурой МДП, снабженный устройством для измерения электропроводности поверхности инверсионного слоя.

26.2.3. Полевой транзистор с диэлектрическим затвором

Представленная на рис. 26.5 схема ДЗПТ очень напоминает схему описанного в предыдущем разделе конденсатора МДП. Область затвора транзистора состоит из подложки из кремния p -типа, диэлектрика, обычно SiO_2 , и металла – затвора; таким образом, мы имеем дело с типичной структурой МДП. Эта структура усложнена за счет двух дополнительных кремниевых элементов n -типа, называемых истоковой

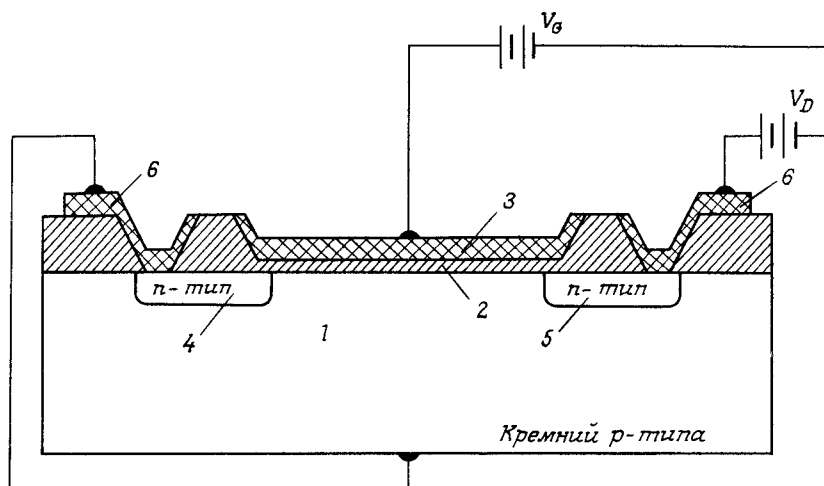


Рис. 26.5. Схема ДЗПТ. 1 — кремниевая подложка *n*-типа; 2 — диэлектрик; 3 — металлический затвор; 4 — исток *n*-типа; 5 — сток *n*-типа; 6 — металлический контакт со стоком и истоком.

областью, или истоком и стоковой областью, или стоком. Электрическая цепь создается за счет металлических контактов со стоком и истоком. Сток и исток позволяют измерять электропроводность инверсионного слоя на поверхности подложки *p*-типа. На металл затвора подается напряжение V_G , а на сток — V_D . Подложка и исток обычно заземлены. При работе измеряют зависимость силы тока I_D , текущего от стока к истоку, от V_G и V_D .

Механизм функционирования ДЗПТ понять несложно, по крайней мере на качественном уровне. Если к стоку приложено невысокое положительное напряжение V_D , а к металлу затвора — напряжение V_G , меньшее порогового напряжения ($V_G < V_T$), то на кремниевой поверхности осуществляется либо накопление, либо обеднение (т.е. инверсия не происходит, и поверхностный слой остается кремнием *p*-типа). В этих условиях электрический ток не может течь от стока к истоку, поскольку сток (кремний *n*-типа) заряжен положительно относительно подложки (кремний *p*-типа); в результате возникает обратный *p*–*n*-переход, практически запирающий систему. Если же V_G становится больше порогового напряжения, то образуется поверхностный инверсионный слой и поверхность кремниевой подложки превращается в кремний *n*-типа. Теперь ток может течь от стока к истоку через инверсионный слой *n*-типа, не пересекая *p*–*n*-переход. Превышающая V_T величина напряжения затвора модулирует число электронов в инверсионном слое и таким образом регулирует эффективную электропроводность инверсионного слоя. Контроль за током стока I_D путем изменения напряжения затвора является основой работы транзистора типа ДЗПТ.

Анализ физической природы ДЗПТ включает нахождение зависимости I_D от напряжений V_G и V_D и от геометрии устройства. Вывод соответствующих уравнений основан на так называемом «анализе регулирования заряда» [3] и включает ряд упрощающих допущений; тем не менее полученные уравнения хорошо согласуются с экспериментальными данными и достаточно просты.

На рис. 26.6 представлена схема ДЗПТ, на которой показаны обедненный слой (часто называемый областью объемного заряда) и инверсионный слой (часто называемый каналом или канальной областью). Приложенное напряжение V_G больше порогового напряжения (иными словами, система находится в состоянии сильной

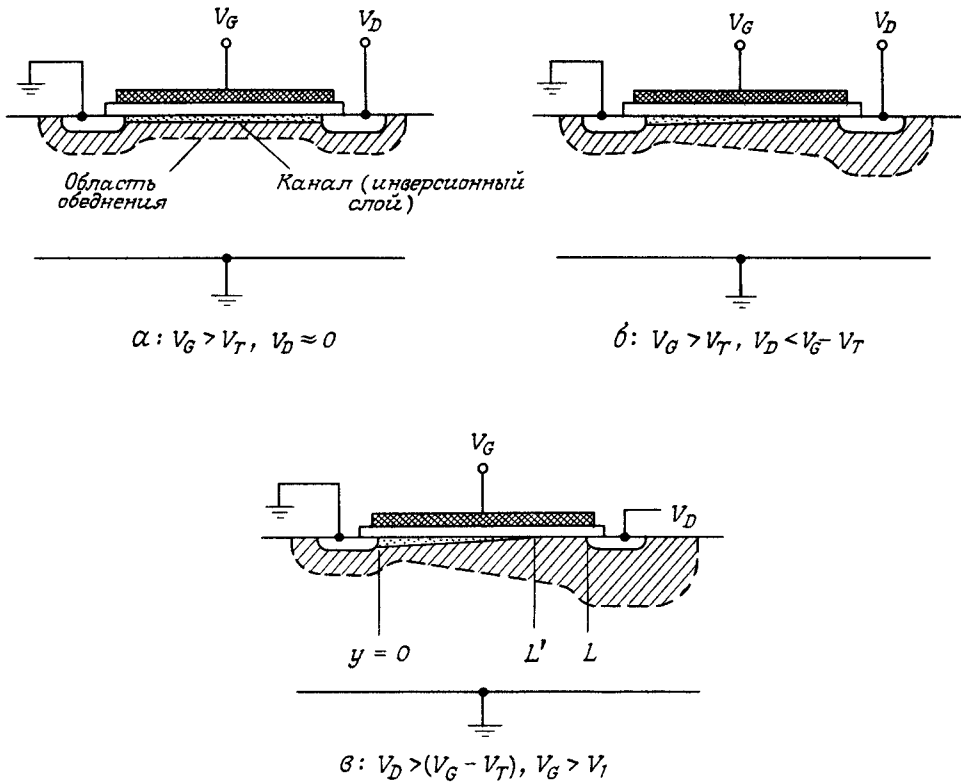


Рис. 26.6. Схема ДЗПТ в поперечном сечении, иллюстрирующая влияние изменения напряжения на инверсионный и обедненный слой. а: напряжение стока очень мало; б: напряжение стока достаточно велико, чтобы вызвать значительное изменение толщины инверсионного и обедненного слоев; в: напряжение стока выше напряжения насыщения; эффективная длина канала уменьшилась от L до L' относительно $y = 0$ в истоке (по данным [3]).

инверсии), а V_D принимается очень малым, так что разность потенциалов в канале не слишком сильно зависит от положения между стоком и истоком. В этом случае легко установить простую взаимосвязь между током, протекающим по каналу, зарядом канала Q_n и временем пролета электронов через канал T_{tr} :

$$I_D = -Q_n/T_{tr}. \quad (26.7)$$

С другой стороны, время пролета равно отношению длины канала L к скорости электронов v_d , которая связана с полем V_D/L и подвижностью электронов в канале μ_n уравнением

$$v_d = \mu_n V_D/L. \quad (26.8)$$

Следовательно, время пролета электронов равно

$$T_{tr} = L^2/\mu_n V_D. \quad (26.9)$$

Заряд канала Q_n — это не что иное, как емкость конденсатора C_0 , умноженная на $V_G - V_T$ (т.е. на часть напряжения затвора, создающую канал). Поскольку емкость конденсатора выражают в виде емкости, отнесенной к единице площади, то необходимо

ввести множитель WL , отражающий площадь затвора:

$$Q_n = -C_0(V_G - V_T)WL. \quad (26.10)$$

Здесь W — ширина затвора, а пороговое напряжение V_T определяется в соответствии с уравнением (26.5).

Подставив уравнения (26.9) и (26.10) в уравнение (26.7), получим следующее выражение для тока стока:

$$I_D = \frac{\mu_n WC_0}{L}(V_G - V_T)V_D. \quad (26.11)$$

Теперь рассмотрим ситуацию, когда напряжение стока в сравнении с напряжением затвора настолько велико, что им уже нельзя пренебречь. Как показано на рис. 26.6, б, в этой ситуации распределение зарядов в канале и области объемного заряда будет иным. Теперь плотность электронов в канале вблизи стока намного уменьшится, поскольку снизилось эффективное напряжение смещения на канале вблизи стока. Аналогично в силу повышения напряжения стока возрастает толщина области обеднения вблизи стока. Упрощенный анализ тока в канале после увеличения напряжения стока дает приближенное описание среднего потенциала между затвором и каналом как $V_G - (V_D/2)$. Тогда заряд канала Q_n будет отличаться от заряда, вычисленного с помощью уравнения (26.10):

$$Q_n = -C_0[V_G - V_T - (V_D/2)]WL. \quad (26.12)$$

Отсюда следует, что ток стока равен

$$I_D = \frac{\mu_n WC_0}{L}\left(V_G - V_T - \frac{V_D}{2}\right)V_D, \quad V_D < V_{D \text{ sat}}. \quad (26.13)$$

Уравнение (26.13) справедливо только тогда, когда напряжение стока меньше $V_G - V_T$ (т.е. для «ненасыщенного» состояния). Если же $V_D > V_G - V_T$ (т.е. в случае «насыщенного» состояния), то разность потенциалов между затвором и каналом вблизи стока меньше или равна нулю. В результате, как показано на рис. 26.6, в, при $V_D > V_G - V_T$ вблизи стока канал исчезает. Если ДЗПТ работает в насыщенном состоянии, то для электронов, движущихся через область обеднения, энергетический барьер перестает существовать; напротив, сильное электрическое поле в этой области ускоряет электроны до максимальной скорости. Следовательно, при $V_D > V_G - V_T$ изменение напряжения стока не влияет на ток стока; уравнение для тока стока в насыщенном состоянии получают, подставляя в уравнение (26.13) выражение для напряжения насыщения стока $V_{D \text{ sat}} = V_G - V_T$:

$$I_D = \frac{\mu_n WC_0}{2L}(V_G - V_T)^2, \quad V_D > V_{D \text{ sat}}. \quad (26.14)$$

Уравнения (26.13) и (26.14) выражают зависимости, графики которых представлены на рис. 26.7. Эти уравнения качественно правильно (хотя количественно и не точно) описывают целый ряд явлений, например насыщенное и ненасыщенное состояния, постоянство силы тока при $V_D > V_{D \text{ sat}}$ и зависимость $V_{D \text{ sat}}$ от V_G и V_T .

На рис. 26.8 представлены графики описываемых уравнениями (26.13) и (26.14) зависимостей тока стока от напряжения затвора V_G . В насыщенном состоянии (в области нелинейной зависимости при малой силе тока) сила тока пропорциональна квадрату напряжения затвора, тогда как в ненасыщенном состоянии между силой тока и напряжением затвора существует линейная зависимость. При дальнейшем повышении напряжения затвора, однако, ток затвора обычно начинает насыщаться и реальные

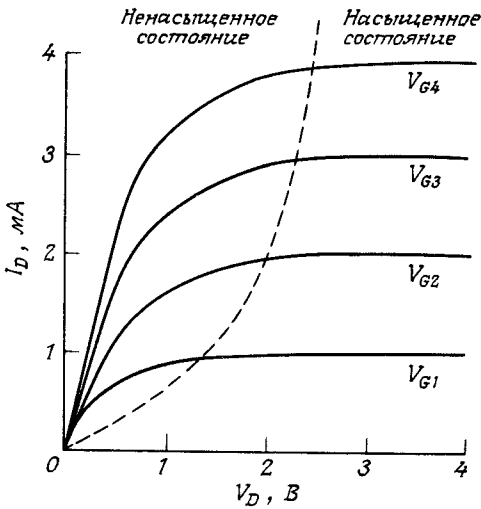


Рис. 26.7. Графики зависимости тока стока от напряжения стока при различных напряжениях затвора, иллюстрирующие процесс насыщения и насыщенное состояние.

зависимости отличаются от предсказываемых теорией. Эти отклонения от теории обусловлены двумя различными эффектами. Во-первых, при большом напряжении затвора поле в инверсионном слое, перпендикулярное направлению тока, снижает эффективную подвижность электронов μ_n , поскольку возрастает вероятность их взаимодействия с поверхностью. Во-вторых, в ДЗПТ обычной геометрии с кремниевой подложкой контактные площадки, на которые подается регулирующее напряжение, обычно располагают на ребрах кристалла, тогда как транзисторы размещают на внутренней поверхности. Тонкие металлические полоски или сильно легированные участки кремния обычно соединяют транзисторы с контактными площадками. Поскольку такие соединения имеют вполне определенное сопротивление, они вносят свой вклад в общее сопротивление на пути от стока к истоку ДЗПТ. При большой силе тока стока обусловленное этим последовательно включенным сопротивлением R_S падение напряжения становится заметным, и фактически между стоком и истоком устанавливается разность потенциалов $V_D - I_D R_S$, отличающаяся от приложенного напряжения

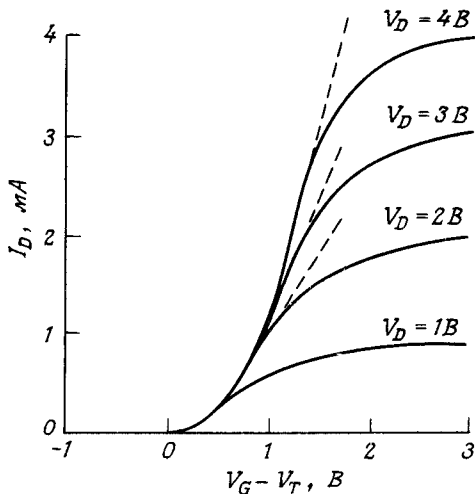


Рис. 26.8. Графики зависимости тока стока от напряжения затвора при различных напряжениях стока. Штрихпунктирными линиями показаны теоретические зависимости, сплошными — экспериментально найденные.

V_D . Таким образом, при большой силе тока это сопротивление обуславливает снижение тока стока.

26.2.4. Химически чувствительный полевой транзистор

Описанный выше ДЗПТ можно трансформировать в ХЧПТ (по крайней мере теоретически), заменив металл затвора химически чувствительной мембраной. Если речь идет о ХЧПТ, чувствительном к частицам в растворе, то, как показано на рис. 26.9, с помощью находящегося в растворе электрода сравнения к области затвора прикладывается определенное напряжение. Сравнивая рис. 26.9 и 26.5 (ХЧПТ и ДЗПТ), нетрудно видеть, что электрические цепи ХЧПТ и ДЗПТ различаются только тем, что в первом металл затвора заменен на комбинацию из электрода сравнения, раствора и химически чувствительной мембраны.

Уравнения, описывающие работу ХЧПТ, легко вывести из соответствующих уравнений для ДЗПТ, учтя разность потенциалов между новыми элементами цепи. В этом разделе будут выведены общие уравнения, описывающие вольт-амперные характеристики устройств через разность потенциалов на новых границах раздела, без анализа зависимостей этой разности потенциалов от химических свойств окружающего электролита. Механизм химической чувствительности ХЧПТ каждого типа и соответствующие уравнения будут рассмотрены в последующих разделах.

Вспомним, что в уравнениях (26.13) и (26.14) символом V_G мы обозначали напряжение, приложенное к металлу затвора, и, следовательно, потенциал на поверхности диэлектрика, контактирующего с металлом затвора. Аналогичные уравнения можно записать и для ХЧПТ, если вместо V_G подставить новый потенциал на поверхности диэлектрика. Этот потенциал будет равен сумме потенциалов на металлическом проводе электрода сравнения (V_G), на границе раздела электрод сравнения – раствор (E_{ref}) и на границе раздела раствор – мембрана ($\phi_{sol-mem}$). Таким путем

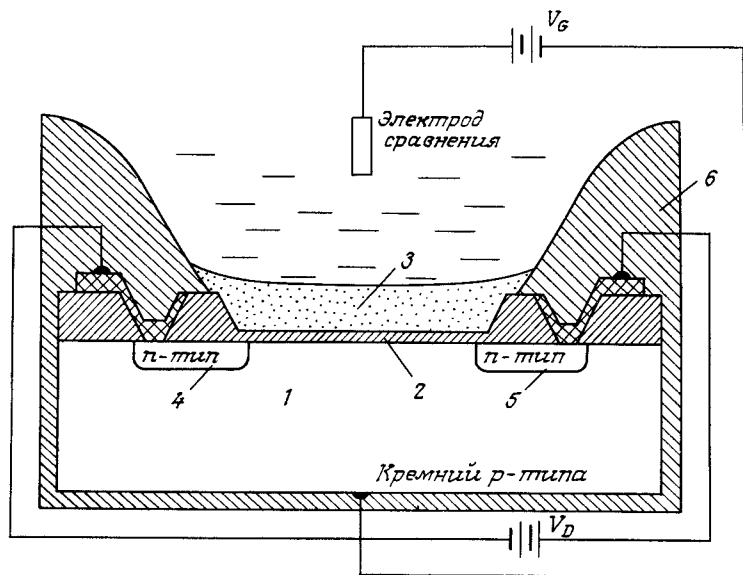


Рис. 26.9. Схема ХЧПТ. 1 – кремниевая подложка; 2 – диэлектрик; 3 – химически чувствительная мембрана; 4 – исток; 5 – сток; 6 – изолирующий герметик.

получим следующие общие уравнения для ХЧПТ в растворе:

$$I_D = \frac{\mu_n W C_0}{L} \left(V_G - V_T^* - E_{ref} - \Phi_{sol-mem} - \frac{V_D}{2} \right) V_D \quad V_D < V_{D sat} \quad (26.15)$$

и

$$I_D = \frac{\mu_n W C_0}{2L} (V_G - V_T^* - E_{ref} - \Phi_{sol-mem})^2 \quad V_D > V_{D sat}. \quad (26.16)$$

Здесь пороговое напряжение обозначено символом V_T^* , поскольку в определение V_T (уравнения (26.5) и (26.6)) входит разность работ выхода металла и полупроводника Φ_{ms} . В случае ХЧПТ разность работ выхода должна быть подразделена на составляющие:

$$\Phi_{ms} = \Phi_{m-sol} + \Phi_{sol-mem} + \Phi_{mem-s}, \quad (26.17)$$

где Φ_{m-sol} , $\Phi_{sol-mem}$, Φ_{mem-s} — разность работ выхода металла и раствора, раствора и мембраны, мембраны и полупроводника соответственно. Поскольку члены E_{ref} и $\Phi_{sol-mem}$ уже учитывают разности работ выхода (Φ_{m-sol} и $\Phi_{sol-mem}$ соответственно), пороговое напряжение ХЧПТ должно описываться следующим уравнением:

$$V_T^* = V_T - \Phi_{m-sol} - \Phi_{sol-mem} = \Phi_{mem-s} - \frac{Q_{ss}}{C_0} - \frac{Q_B}{C_0} + 2\phi_F, \quad (26.18)$$

где заряд диэлектрика считается пренебрежимо малым.

Таким образом, уравнения (26.15)–(26.18) описывают вольт-амперные характеристики ХЧПТ независимо от механизма возникновения разности потенциалов $\Phi_{sol-mem}$ на границе раздела раствор–мембрана. Здесь важно понять, что ток стока зависит от этой разности потенциалов и, следовательно, ХЧПТ является преобразователем с чрезвычайно высоким сопротивлением, детектирующим эту разность потенциалов. С помощью мембран, потенциал которых зависит от концентрации определенных частиц в растворе, ПТ-преобразователь приобретает химическую селективность. В последующих разделах рассматриваются различные схемы, придающие полевому транзистору чувствительность к разнообразным соединениям.

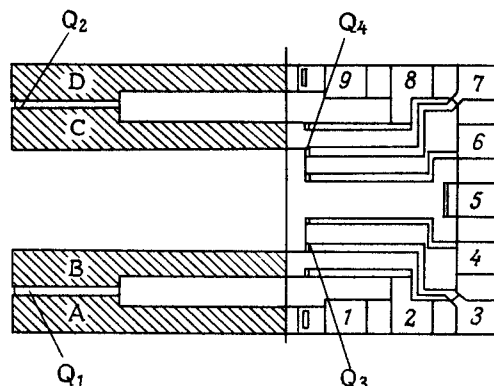
26.3. Производство сенсоров

Процесс производства сенсоров на основе ХЧПТ можно подразделить на два этапа. На первом этапе в кремниевой пластине (обычно диаметром 50 или 75 мм) создают элементы множества (от нескольких сотен до тысячи) микросхем; здесь каждая операция одновременно воздействует на все будущие микросхемы и поэтому не требует больших трудозатрат. Второй этап производства сенсоров включает операции, выполняемые после того, как пластина разрезана на отдельные микросхемы; сюда относятся установка микросхемы на опоре, создание электрических соединений, герметизация сенсора и обычно осаждение химически чувствительной мембраны. Поскольку на втором этапе каждый сенсор обрабатывают индивидуально, то соответствующие трудозатраты могут быть очень высокими.

26.3.1. Производство пластин

В каждой лаборатории, в которой изготавливают ХЧПТ, применяют свои операции и свои технологические процессы, поэтому детальное описание всего процесса лишено смысла и не входит в задачи настоящего обзора. С подробным описанием производства полупроводниковых устройств читатель может ознакомиться в специальных монографиях, например [5].

Рис. 26.10. Типичная микросхема ХЧПТ. Описание см. в тексте (по данным [2]).



Производство ХЧПТ с каналом *n*-типа начинается с изготовления кремниевой пластины, легированной бором, который превращает ее в полупроводник *p*-типа. Затем путем фотолитографического маскирования и введения атомов фосфора в поверхность кремния посредством имплантации ионов или химической диффузии формируют сток и исток *n*-типа соответствующего рисунка. Диэлектрический затвор из диоксида кремния (обычно толщиной 50–100 нм) создают термическим окислением поверхности кремния при 1000–1200 °С в атмосфере кислорода. Слой нитрида кремния (также толщиной 50–100 нм), который выполняет роль второго диэлектрика, покрывающего слой диоксида кремния и, кроме того, придает устойчивость к гидратации, обычно формируют химическим осаждением из газовой фазы (смеси азота, силана SiH₄ и аммиака NH₃) при 600–800 °С. Электрические контакты с истоком, стоком и подложкой создают путем протравливания отверстий в диэлектрике и напыления металлических (обычно алюминиевых) полосок, соединяющих эти элементы с контактными площадками на периферии кристалла. По окончании всех указанных операций пластину скрайбируют алмазным резцом и затем разрезают на отдельные микросхемы.

В разных лабораториях, изучающих ХЧПТ, применяют кристаллы различной геометрии. На рис. 26.10 представлена схема кристалла, широко изучавшегося в Университете штата Юта (США) [2]; такую геометрию ХЧПТ можно считать наиболее типичной. Кристалл размером 1,28 × 2,16 мм имеет 4 ПТ, два из которых (Q₁ и Q₃) являются ХЧПТ, а два других (Q₂ и Q₄) — обычными ДЗПТ. Все затворы имеют размер 20 × 400 мкм. Символами А, В, С и D обозначены области стока и истока двух ХЧПТ, а цифрами от 1 до 9 — металлические контактные площадки, соединенные электрическими контактами со схемой внешнего управления. Два ХЧПТ размещают на одном конце микросхемы, а контактные площадки — на другом; таким путем облегчается герметизация контактных площадок, соединительных проводов и ребер кристалла при негерметизированных затворах ХЧПТ.

26.3.2. Монтаж сенсоров

Каждая лаборатория опять-таки использует свою компоновку и свои способы выполнения операций монтажа (установку подложки и проводов, герметизацию) сенсоров на основе ХЧПТ. На рис. 26.11 представлена конструкция сенсора, использовавшегося автором этого обзора в большинстве своих работ [6]. Опорой кристалла с микросхемой (1) является стеклянная трубка наружным диаметром 3 мм. В трубке размещен изолированный медный провод (2), согнутый у одного конца под

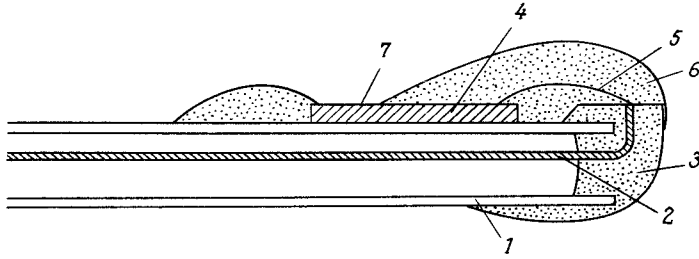


Рис. 26.11. Схема типичного сенсора на основе ХЧПТ. 1 – стеклянная трубка; 2 – медные провода; 3 – герметик (эпоксидная смола); 4 – микроплата ХЧПТ; 5 – алюминиевый провод; 6 – герметик (эпоксидная смола); 7 – негерметизированная область затвора.

прямым углом и закрепленный эпоксидной смолой (3). Затвердевшую эпоксидную смолу сошлифовывают и полируют так, что образуется плоская поверхность, из которой выступают концы медного провода, служащие контактными площадками для соединения с кристаллом. Затем с помощью цианакрилатного клея на наружной поверхности стеклянной трубки монтируют микроплату ХЧПТ (4). Электрические соединения между кристаллом и медным проводом создают с помощью алюминиевого провода (5) диаметром 25 мкм и установки для ультразвуковой сварки. Затем все

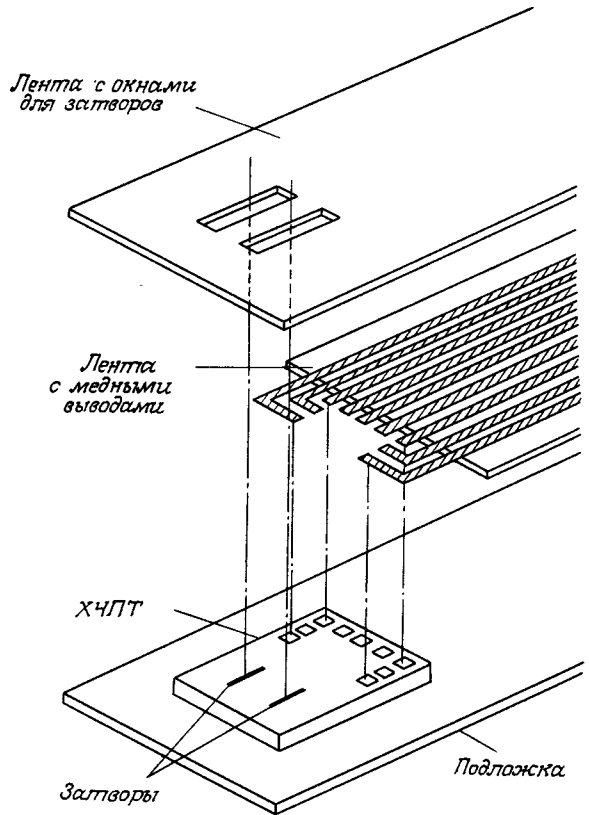


Рис. 26.12. Схема процесса герметизации с помощью полиимидной пленки, который в принципе может быть автоматизирован (по данным [7]).

медные и алюминиевые провода и весь кристалл, за исключением области затвора (7), герметизируют эпоксидной смолой (6). Герметик изолирует микросхему от затвора; он должен сохранять изоляционные свойства на протяжении всего времени работы системы в водных растворах. После затвердевания эпоксидной смолы обычно устанавливают химически чувствительные мембраны; эта операция описана ниже в соответствующих разделах. Большинство операций выполняют под стереомикроскопом с 10–40-кратным увеличением, облегчающим сборку крохотных элементов сенсора.

Хо и другие [7] описали технологию монтажа ХЧПТ, которую в принципе можно автоматизировать. Как упоминалось выше, автоматизация операции герметизации позволила бы значительно снизить стоимость сенсоров ХЧПТ и тем самым сделать их производство экономически выгодным. Эта технология схематично представлена на рис. 26.12. Кристалл с микросхемой устанавливают на подложке (полиимидной ленте), после чего на него накладывают вторую полиимидную ленту с медными выводами, которые затем соединяют с контактными площадками микросхемы с помощью ультразвуковой или термокомпрессионной сварки. Наконец, накладывают третью полиимидную ленту с окнами; ее прочно скрепляют с поверхностью кристалла так, что весь кристалл оказывается герметизированным, за исключением химически чувствительных затворов ПТ. Пока что описанные операции выполняют вручную под микроскопом, но в принципе весь описанный процесс можно автоматизировать.

26.4. Схемы управления и измерения

Измерения с помощью ХЧПТ обычно выполняют одним из двух способов. В первом способе напряжение затвора остается постоянным и измеряют ток стока, а во втором путем изменения напряжения затвора с помощью системы обратной связи поддерживают постоянный ток стока. Описанная ниже аналоговая схема управления и измерения представляет собой, по-видимому, простейшую работоспособную систему такого типа. Несмотря на то, что в настоящее время разработаны и испытаны гораздо более сложные схемы и не представляет никаких затруднений управление с помощью микропроцессоров, рассматриваемая здесь схема является простым и в то же время вполне удовлетворительным способом управления ХЧПТ.

26.4.1. Режим с постоянным напряжением затвора

На рис. 26.13 представлена простая схема такого режима [6]. К стоку и электроду сравнения прикладывают постоянные напряжения V_D и V_G соответственно. Подложку и исток соединяют зажимом, а вывод подают на операционный усилитель, выполняющий функции преобразователя ток–напряжение. Выходное напряжение операционного усилителя равно $-R_1 I_D$. Изменение потенциала на границе раздела мембрана–раствор определяют по изменению тока стока. К сожалению, ток стока нелинейно зависит от напряжения затвора во всем диапазоне. Поэтому рассчитать изменение потенциала на границе раздела по изменению тока стока можно лишь в том случае, если известна зависимость между этими двумя переменными в любой точке рабочего диапазона. Преимуществом такого способа измерения является возможность одновременного контроля нескольких ХЧПТ (с одинаковым постоянным напряжением затвора), находящихся в одном растворе, с помощью одного электрода сравнения.

26.4.2. Режим с постоянным током стока

Простая схема, работающая в таком режиме, представлена на рис. 26.14 [6]. Как и в предыдущем случае, здесь к стоку приложено постоянное напряжение, а ток стока

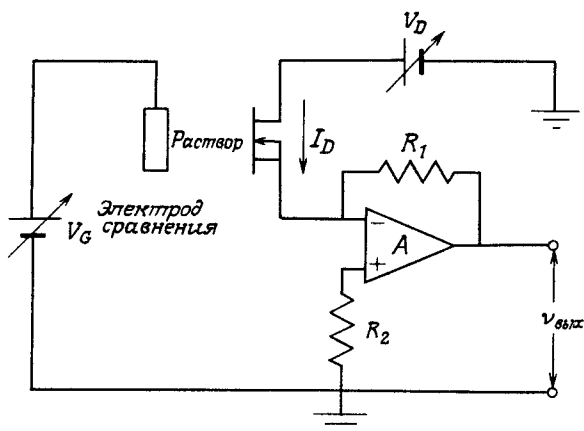


Рис. 26.13. Электрическая схема для измерения I_D при постоянном напряжении затвора. A — операционный усилитель; $R_1 = 1 \text{ кОм}$, $R_2 = 470 \text{ Ом}$.

измеряют с помощью операционного усилителя A_1 . Выходное напряжение операционного усилителя V_1 подается на делитель напряжения, включающий сопротивления R_2 и R_3 . Напряжение на другом конце делителя контролируется V_{set} . Поскольку R_2 и R_3 равны, то напряжение между ними будет равно среднему между V_1 и V_{set} . Это напряжение измеряют с помощью операционного усилителя A_2 . Выходное напряжение этого усилителя подается на электрод сравнения и таким образом влияет на ток стока ХЧПТ. Отрицательный вход усилителя A_2 связан с заземлением через R_4 . При работе оба входных напряжения должны быть равны друг другу, т.е. равны нулю, и, следовательно, выходное напряжение A_1 должно быть равно $-V_{\text{set}}$. Далее, поскольку выходное напряжение операционного усилителя A_1 равно $-R_1 I_D$, то I_D должно быть равно V_{set}/R_1 . Это требование выполняет обратная связь с операционным усилителем A_2 , который, изменяя выходное напряжение V_G , регулирует ток стока. Таким образом, операционный усилитель A_2 поддерживает постоянный ток стока ($I_D = V_{\text{set}}/R_1$) путем изменения напряжения на электроде сравнения. Если потенциал на границе раздела

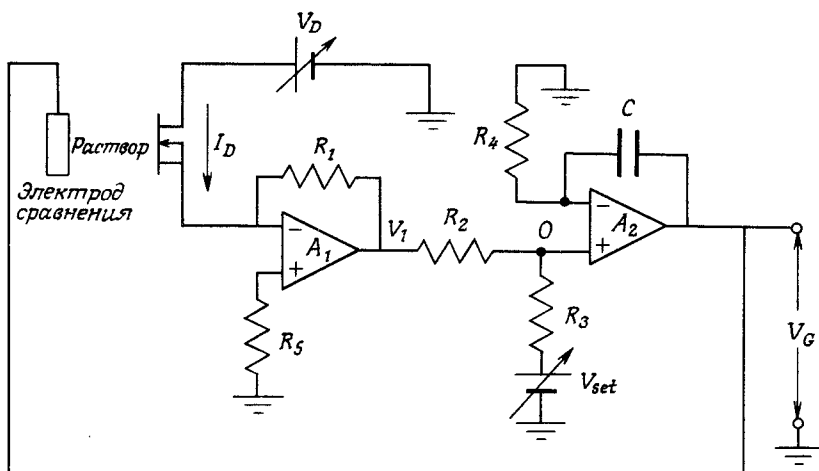


Рис. 26.14. Электрическая схема для измерения V_G при постоянном токе стока. A_1 , A_2 — операционные усилители; $R_1 = 1 \text{ кОм}$, $R_2 = R_3 = 100 \text{ кОм}$, $R_4 = 20 \text{ кОм}$, $R_5 = 470 \text{ Ом}$, $C = 10 \text{ нФ}$.

мембрана – раствор изменяется, то схема с обратной связью компенсирует это изменение и тем самым обеспечивает постоянство тока стока. Таким путем можно непосредственно измерять изменение потенциала на границе раздела.

Недостатком этого способа измерения является невозможность одновременного контроля нескольких сенсоров, поскольку напряжение затвора каждого сенсора необходимо регулировать независимо, а в растворе может находиться только один электрод сравнения. Тем не менее обычно предпочитают именно этот способ измерения, поскольку он позволяет непосредственно оценить изменение потенциала на границе раздела мембрана – раствор.

26.5. Ионоселективный полевой транзистор

Ионоселективный полевой транзистор представляет собой сочетание ионоселективного электрода (ИСЭ) с твердотельной электроникой. Применение обычных ИСЭ затруднено из-за высокого уровня шума, обусловленного большим электрическим сопротивлением ионоселективной мембраны; провода, соединяющие электрод, который обладает большим общим сопротивлением, с усилителем (обычно рН-метром с высоким общим входным сопротивлением), выполняют функции «антенн», реагирующих на любые изменения локального электромагнитного поля. Для снижения уровня шума обычно применяют экранированный кабель минимальной длины. Однако даже при этом условии часто приходится принимать дополнительные меры, ограничивающие возможные помехи (например, для достижения стабильности показаний прибора оператору обычно необходимо стоять без малейшего движения или вообще отойти подальше от электрода и электроники). В ИСПТ эта проблема (сведение длины проводов к минимуму) решается сама собой, поскольку здесь ионоселективная мембрана непосредственно контактирует с затвором входного транзистора усилителя с высоким общим сопротивлением; иными словами, длина проводов равна нулю. Для облегчения измерений транзистор отделяют от усилителя и устанавливают на напоминающей электрод опоре, которую можно опустить в изучаемый раствор. Выходной сигнал ПТ с низким общим сопротивлением связывают с электроникой неэкранированными проводами любой длины; ИСПТ преобразует общее сопротивление *in situ* и поэтому не подвержен влиянию изменения локальных электромагнитных полей.

26.5.1. Теория

Способность ИСПТ реагировать на ионы обусловлена химически чувствительными ионоселективными мембранами, покрывающими затвор транзистора. В ИСПТ применяют те же мембраны, которые были ранее разработаны для ИСЭ и описаны в работах [8–10]; в этих работах подробно рассмотрены механизм действия и термодинамика ионоселективных мембран.

Селективность и чувствительность «хорошей» ионоселективной мембраны обусловлена тем, что граница раздела раствор–мембрана характеризуется очень низким энергетическим барьером для транспорта ионов одного типа и сравнительно высоким энергетическим барьером для транспорта ионов всех других типов. В электрохимии обладающие такими свойствами границы раздела называют неполяризованными. Если концентрация ионов, преодолевающих при транспорте через мембрану только невысокий энергетический барьер, изменяется, то эти ионы диффундируют по новому градиенту концентрации через границу раздела. Напротив, все другие ионы в силу высокого энергетического барьера не могут проникнуть через границу раздела. Например, если ионоселективная мембрана селективна по отношению к ионам калия и если в растворе повысилась концентрация хлорида калия, то ионы калия начнут

перетекать из раствора в мембрану; напротив, хлорид-ионы неспособны диффундировать в мембрану в силу высокого энергетического барьера. В результате транспорта ионов одного заряда через границу раздела без участия соответствующих противоионов изменяется потенциал границы раздела; это изменение вынуждает ионы двигаться против градиента концентрации. Изменение потенциала сначала замедляет, а затем останавливает результирующий перенос ионов через границу раздела. Следовательно, изменение концентрации данного иона приводит к изменению потенциала границы раздела $\Delta\phi_{\text{sol-mem}}$, которое можно измерить с помощью ИСПТ. Анализ термодинамики системы помогает выявить взаимосвязь между изменением потенциала и концентрацией иона.

Если ион i свободно пересекает границу раздела между раствором и мембраной, то в состоянии равновесия электрохимические потенциалы иона в двух фазах $\tilde{\mu}_{i,\text{sol}}$ и $\tilde{\mu}_{i,\text{mem}}$ должны быть равны:

$$\tilde{\mu}_{i,\text{sol}} = \tilde{\mu}_{i,\text{mem}}. \quad (26.19)$$

Электрохимический потенциал иона i по определению равен

$$\tilde{\mu}_i = \mu_i + z_i F \phi_i. \quad (26.20)$$

Здесь z_i – заряд иона; F – постоянная Фарадея; ϕ_i – потенциал фазы, в которой существуют ионы i ; μ_i – химический потенциал ионов i , равный

$$\mu_i = RT \ln(a_i) + \mu_i^0, \quad (26.21)$$

где R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, μ_i^0 – стандартный химический потенциал иона i ; a_i – его активность (в разбавленных растворах приблизительно равная концентрации). Записав уравнения (26.20) и (26.21) для ионов i в мембране и в растворе и подставив полученные выражения в уравнение (26.19), получим уравнение Нернста, описывающее взаимосвязь между активностью иона и потенциалом границы раздела:

$$E = \phi_{\text{sol-mem}} = E^0 - \frac{RT}{zF} \ln(a_i), \quad (26.22)$$

где a_i – активность иона в растворе; активность иона в мембране обычно считается большей и постоянной и поэтому учитывается в E^0 . Теперь, подставив уравнение (26.22) в уравнения (26.15) и (26.16), получим выражения для ионоселективного отклика ИСПТ на изменение активности иона i :

$$I_D = \frac{\mu_n WC_0}{L} \left\{ V_G - V_T^* - E_{\text{ref}} - E^0 + \frac{RT}{zF} \ln(a_i) - \frac{V_D}{2} \right\} V_D, \quad V_D < V_{D,\text{sat}} \quad (26.23)$$

и

$$I_D = \frac{\mu_n WC_0}{2L} \left\{ V_G - V_T^* - E_{\text{ref}} - E^0 + \frac{RT}{zF} \ln(a_i) \right\}^2, \quad V_D > V_{D,\text{sat}} \quad (26.24)$$

26.5.2. Ионоселективные мембраны для ИСПТ

Как уже отмечалось выше, в ИСПТ обычно применяют те же мембраны, что и в ИСЭ. По сути дела, сенсоры этих двух типов различаются лишь электрическими схемами для измерения изменений потенциала на границе раздела раствор – мембрана. Идентичны и механизмы возникновения потенциала в ИСПТ и ИСЭ. Ниже рассматриваются три типа ионоселективных мембран, применяющихся в ИСПТ.

26.5.2.1. Твердотельные мембраны. В первом ИСПТ, описанном Бергвельдом [11],

была применена твердотельная рН-чувствительная мембрана из SiO_2 . Вскоре после этого Мацуо и другие [12] описали ИСПТ с твердотельной мембраной из нитрида кремния (Si_3N_4). В последующие годы, однако, SiO_2 практически перестали применять в качестве рН-чувствительного материала для изготовления мембран ИСПТ, поскольку он легко гидратируется и теряет изоляционные свойства, необходимые для функционирования ХЧПТ. Изучались также твердотельные рН-чувствительные мембраны, изготовленные из Al_2O_3 [13], ZrO_2 и Ta_2O_5 [14].

Твердотельные ионоселективные мембраны привлекают внимание прежде всего потому, что их можно осаждать на ИСПТ с помощью обычных операций, применяющихся при изготовлении интегральных схем. Кроме того, такие мембраны можно осаждать на всю пластину до ее разрезания на отдельные микросхемы, что значительно сокращает трудозатраты при производстве сенсоров и снижает стоимость последних.

Из указанных неорганических материалов, как оказалось, наилучшими характеристиками обладают Al_2O_3 и Ta_2O_5 , которые обеспечивают наклон зависимости от рН, равный 52–58 мВ/рН, время 95%-ного срабатывания не более нескольких секунд, почти пренебрежимо малый дрейф и очень небольшой гистерезис [13, 14].

В разработке твердотельных мембран, чувствительных по отношению к другим ионам, достигнуты лишь скромные успехи. К сожалению, многие материалы, широко применяющиеся в ИСЭ, не удается осадить с помощью обычных операций изготовления интегральных схем и таким образом изучить возможность их использования в ИСПТ. Тем не менее Бак и Хаклмен [15] разработали твердотельную мембрану из бромида серебра, селективную по отношению к бромид-ионам, а Эсами и Мацуо [16] — ионоселективные твердотельные мембраны из алюмосиликатного или боросиликатного стекла. Последние обладали линейным откликом на ионы натрия с наклоном около 55 мВ/рNa в диапазоне рNa 0–3 и обеспечивали измеримый отклик вплоть до рNa 5.

26.5.2.2. Полимерные мембраны. В ИСЭ и ИСПТ применяют одни и те же полимерные мембраны. Как правило, мембрану, разработанную специально для ИСЭ, можно непосредственно использовать и в ИСПТ, поэтому во избежание повторений в этом разделе мы не будем рассматривать все типы ионоселективных мембран.

Полимерные мембраны обычно наносят на область затвора ИСПТ в виде раствора в летучем растворителе с последующим упариванием. Обычно эту операцию приходится повторять несколько раз; только таким путем удается создать мембрану, лишенную микроотверстий и имеющую толщину более 50 мкм. Образующиеся случайно микроотверстия после заполнения электролитом превращаются в шунты, замыкающие электрическую цепь и фактически выводящие ИСПТ из строя. Из различных ионоселективных мембран в сочетании с ИСПТ детальнее других изучались мембраны, чувствительные к ионам калия и кальция. Калийселективная мембрана на поливинилхлоридной матрице, высокопластифицированной диоктиладипатом по методике Банда и других [17], содержит ионофор валиномицин. В кальцийселективной мембране роль ионофора выполняет *n*-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенилфосфорная кислота, находящаяся в аналогичной пластифицированной поливинилхлоридной матрице [18]. На рис. 26.15 представлена типичная кривая выходного сигнала ИСПТ с такими мембранами [19].

26.5.2.3. Гетерогенные мембраны. Гетерогенные мембраны впервые были разработаны Пунгором [20]; они особенно интересны с точки зрения использования в ИСПТ, поскольку их изготовление не связано с трудностями, типичными для твердотельных мембран. В общем случае гетерогенная мембрана состоит из полупроводникового электродного материала, обычно малорастворимой неорганической соли в виде тонкоизмельченного порошка, иммобилизованного в полимерной матрице. Ширазицу и

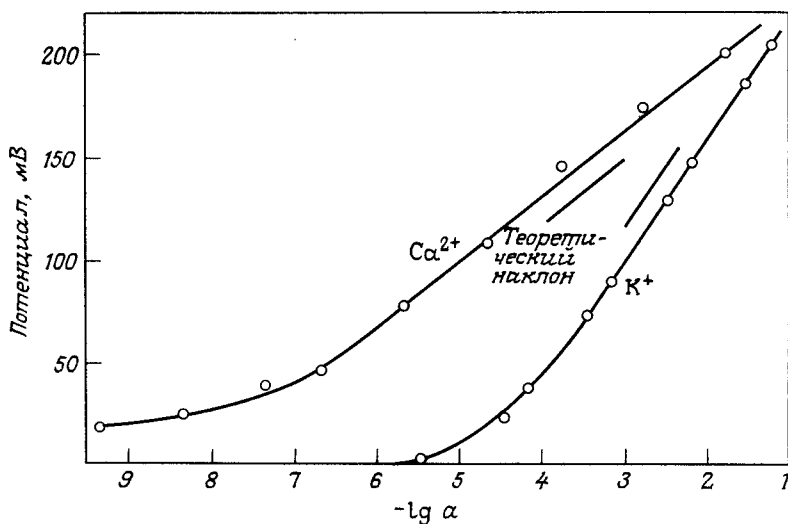


Рис. 26.15. Выходные сигналы кальций- и калий-селективного ИСПТ с полимерными ионоселективными мембранами (по данным [19]).

другие [21] описали ИСПТ с гетерогенными мембранами, чувствительными к хлорид-, иодид- и цианид-ионам, на основе солей серебра в эластомере – полифторированном фосфазине (ПФФ). Хлоридселективные мембраны изготавливали из порошкообразного хлорида серебра и ПФФ в отношении 3:1 (по массе); лучшими характеристиками

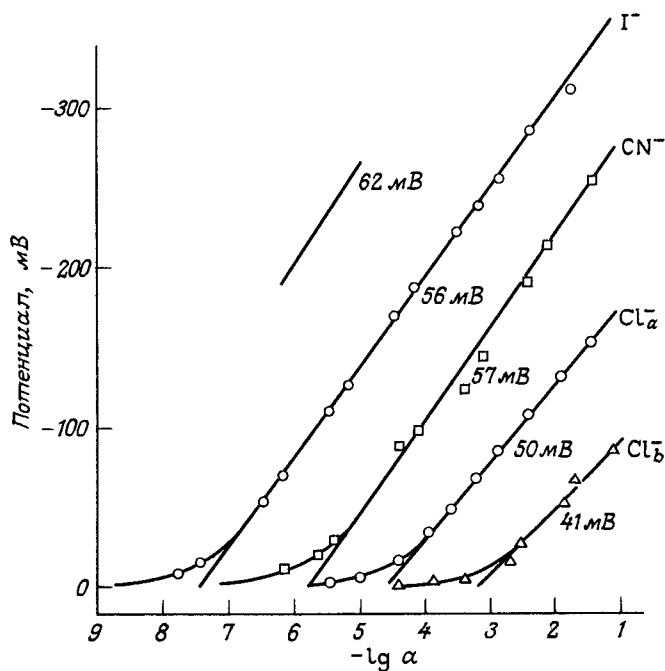
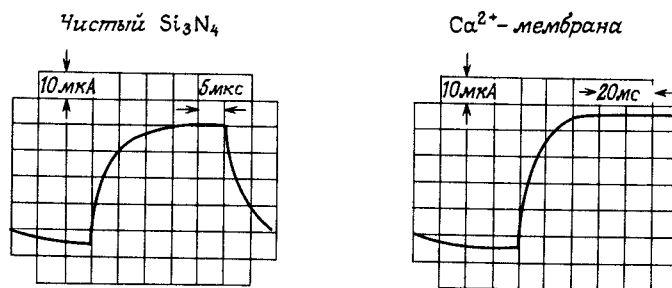


Рис. 26.16. Выходные сигналы хлорид-, иодид- и цианидселективного ИСПТ с гетерогенными мембранами (по данным [22]).

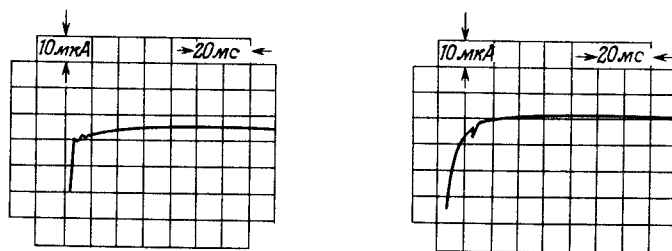
обладает мембрана на основе смеси хлорида и сульфида серебра (4:1). Гетерогенная мембрана, чувствительная одновременно к иодид- и цианид-ионам, построена из смеси 75% иодида серебра и 25% сульфида серебра и ПФФ. Выходные сигналы различных ИСПТ такого типа представлены на рис. 26.16; здесь символами Cl_a^- и Cl_b^- обозначены сигналы ИСПТ с мембранами, содержащими смесь $AgCl$ и Ag_2S и только $AgCl$ соответственно.

26.5.3. Временные характеристики

Одно из основных преимуществ ИСПТ связано с тем, что в нем *in situ* осуществляется трансформация полного сопротивления, благодаря чему отпадает необходимость в электрических соединениях между мембраной и усилителем и тем самым устраняется паразитная емкость таких соединений. Следовательно, постоянная времени RC -цепи в случае выходного сигнала ИСПТ должна быть значительно меньше, чем в случае обычных ИСЭ. Макбрайд и другие [19] сообщали о результатах измерения электрических и химических временных характеристик твердотельных рН-чувствительных мембран на основе Si_3N_4 и кальций-чувствительных полимерных мембран (рис. 26.17). Электрические временные характеристики определяли, прикладывая к электроду сравнения квадратно-волновое напряжение и измеряя ток стока. Химические временные характеристики определяли, вводя с помощью шприца через мембрану раствор, содержащий высокую концентрацию изучаемого иона. Оказалось, что полимерная мембрана медленнее реагирует на изменение напряжения в силу динамических ограничений, свойственных связанной с затвором мембране. Замедленный отклик на изменение концентрации иона (по сравнению с откликом на изменение напряжения) свидетельствует о том, что время отклика лимитируется диффузионным слоем на границе раздела мембрана-раствор. Отсюда следует, что



а: Электрические временные характеристики



б: Химические временные характеристики

Рис. 26.17. Временные характеристики ИСПТ с рН-чувствительной мембраной из нитрида кремния и кальций-селективной мембраной (по данным [19]).

химические временные характеристики ИСПТ и ИСЭ должны быть примерно одинаковыми.

26.5.4. ИСПТ с висящей сеткой

Эксплуатация ИСПТ с полимерными ионоселективными мембранами часто затрудняется из-за низкой адгезии мембраны к поверхности сенсора. В обычных ИСЭ мембрана механически укрепляется на одном конце трубки и вопрос об адгезии вообще не возникает. Напротив, в ИСПТ мембрана наносится на поверхность затвора сенсора и должна удерживаться на этой поверхности в силу физической или химической адгезии. В различных лабораториях по-разному пытались решить эту проблему, например путем нанесения мембраны на большую площадь сенсора или с помощью поливинилхлоридного якорного кольца, укрепленного в герметике по периметру затвора [23], или посредством изменения химического состава мембраны даже в ущерб ее электрохимическим характеристикам.

Низкая адгезия мембраны приводит к ее постепенному отделению от герметика и поверхности транзистора и таким путем к появлению электролитических шунтов вокруг мембраны. В таких случаях измерение электрохимического потенциала на границе раздела мембрана-раствор дает непредсказуемые результаты. Любое механическое воздействие на мембрану, например при сильном потоке электролита или в ходе экспериментов *in vivo*, когда устройство приходится погружать в биологические ткани, обычно приводит к полному отделению мембраны от ИСПТ.

В качестве одного из путей решения проблемы адгезии мембран Блэкберн и Джаната [24] предложили ИСПТ с висящей сеткой (ВС ИСПТ). Висящая сетка представляет собой трехмерную структуру на поверхности ПТ над затвором сенсора и служит для закрепления мембраны. Как схематично показано на рис. 26.18, висящая сетка—это полимерная пленка, закрепленная на некотором расстоянии от затвора и имеющая в области над последним множество отверстий. Когда раствор материала полимерной мембраны наносят на поверхность затвора, он проникает под сетку, вытесняя воздух, а также заполняет пространство над сеткой. Как показано на рис. 26.19, после испарения растворителя сетка становится неотъемлемой частью мембраны, прочно удерживающей ее на поверхности.

Висящую сетку изготавливают, нанося полимерную пленку (полиимид или фоторезист) на тонкую (1 мкм) прямоугольную алюминевую пластинку. Отверстия (квадраты со стороной 10 мкм) прodelывают фотолитографически с последующим травлением с помощью обычных в технологии изготовления интегральных схем операций. Затем через эти отверстия алюминий вытравливают из-под сетки, после чего образуется собственно полимерная сетка, отстоящая от диэлектрика затвора примерно на 1 мкм.

Электрические и химические испытания ВС ИСПТ показали, что сетка обеспечивает

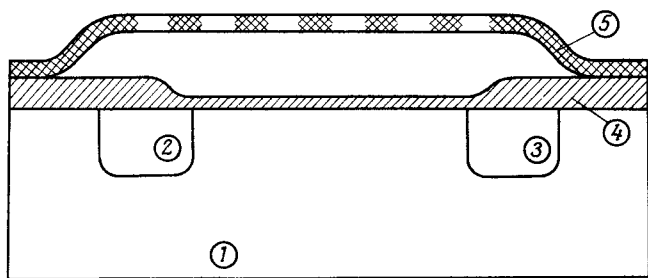
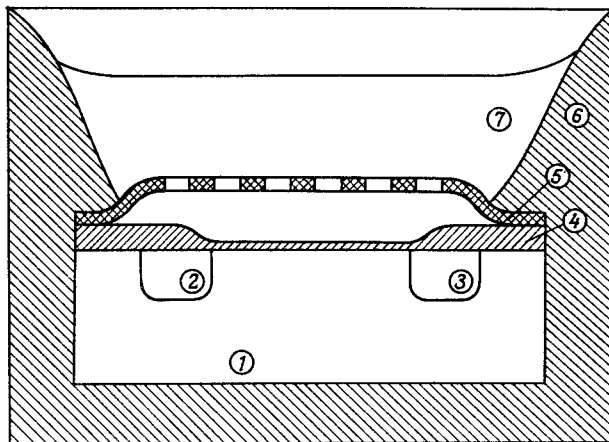


Рис. 26.18. Схема ИСПТ с висящей сеткой до герметизации и осаждения мембраны. 1—кремниевая подложка; 2—исток; 3—затвор; 4—диэлектрик; 5—полимерная висящая сетка (по данным [24]).

Рис. 26.19. Схема ИСПТ с висящей сеткой после герметизации и осаждения мембраны. 1—кремниевая подложка; 2—исток; 3—сток; 4—диэлектрик; 5—полимерная висящая сетка; 6—герметик; 7—ионоселективная мембрана (по данным [24]).



необходимый эффект. Сетка не влияет на электрические характеристики сенсора. Выходной сигнал двух наборов калий-селективных ИСПТ, в одном из которых не применялись никакие способы для улучшения адгезии мембраны, а во втором использовались устройства типа ВС, контролировали в течение нескольких недель. Уже через 24 ч пребывания в растворе в первом наборе ИСПТ появились первые признаки плохой адгезии мембраны: после ступенчатого изменения концентрации калия появил-

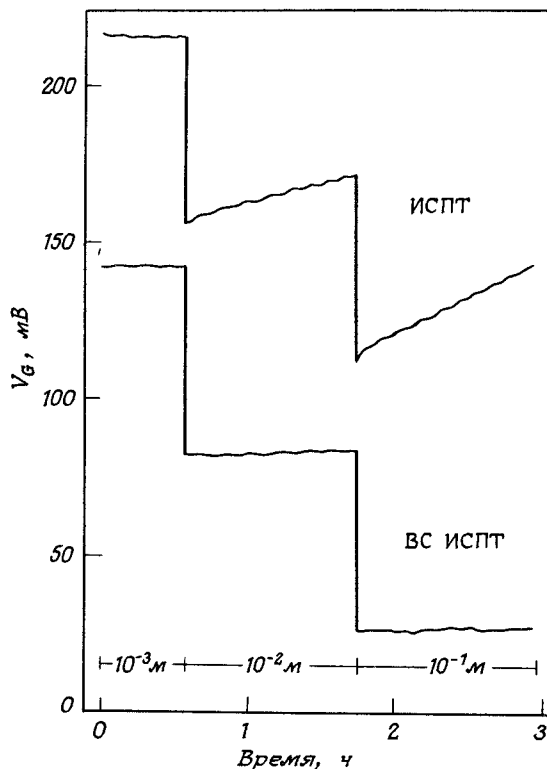


Рис. 26.20. Типичные градуировочные кривые калий-селективных обычного ИСПТ и ВС ИСПТ после недельного пребывания в растворе (по данным [24]).

ся заметный дрейф потенциала. Напротив, ВС ИСПТ успешно эксплуатировали в течение 60 дней без всякого дрейфа, пока они не вышли из строя по иным причинам. На рис. 26.20 представлены типичные калибровочные кривые ИСПТ и ВС ИСПТ после их недельного пребывания в растворе.

26.6. Химические чувствительные полевые транзисторы на основе ферментов

Рассмотренные в настоящей книге (гл. 1; гл. 9 и далее) и в недавно опубликованном обзоре [25] ферментные электроды привлекли большое внимание. Ферментные электроды представляют собой один из немногих инструментов, позволяющих в настоящее время определять биологические молекулы электрохимическими методами. Важнейшим элементом соответствующих сенсоров является тонкая проницаемая мембрана, в которую включен фермент и которая располагается на поверхности, например ИСЭ. В результате реакции фермента с субстратом образуются продукты или расходуется субстрат; концентрации продуктов или субстрата можно контролировать с помощью этого ИСЭ. Применение для контроля концентраций ИСПТ вместо ИСЭ обеспечивает ряд определенных преимуществ. Во-первых, полевой транзистор на основе ферментов (ФПТ) выгодно отличается от ферментного ИСЭ тем же, чем любой ИСПТ от соответствующего ИСЭ. Во-вторых, миниатюрность и соответствующая геометрия ИСПТ способствуют сокращению необходимого количества фермента до минимума, что особенно важно в случае дорогостоящих ферментов. В-третьих, в описанной Карасом и другими [26] конструкции сенсора удачно решены задачи регулирования толщины мембраны и ее адгезии к поверхности ФПТ; поэтому отпадает необходимость в каких бы то ни было способах крепления мембраны, как правило, обязательных в обычных ферментных электродах. В-четвертых, ФПТ обычно имеет несколько транзисторов на одном кристалле; поэтому второй транзистор можно использовать в качестве стандарта, откликающегося на любые электрические, химические и физические стимулы, но не на ферментативную реакцию. Следовательно, математическая разность между сигналами двух ПТ содержит только необходимую информацию о концентрации определяемого вещества при существенно сниженном уровне фона.

В отличие от довольно обширной литературы, посвященной ферментным электродам, опубликовано лишь несколько сообщений о ФПТ. Впервые ФПТ, чувствительный к мочеvine и основанный на аммиачном газочувствительном ПТ, описан Даниельсоном и другими [27]. Позднее Карас и Джаната [28, 29] разработали пенициллин-селективный ФПТ, Ханазото и Шионо [30], а также Карас и другие [26] — глюкозо-селективный ФПТ, а Мияхара и другие [31] — ФПТ, чувствительный к мочеvine и ацетилхолину (ACh).

26.6.1. Теория

Если на ионоселективную мембрану ИСПТ нанести тонкий слой ферментсодержащего геля, то мы получим ФПТ. Схема типичного ФПТ представлена на рис. 26.21. Механизм и теория формирования электрохимического отклика ФПТ аналогичны описанным Тернером (см. гл. 15) для ферментного электрода и Карасом и другими [32] для ФПТ, поэтому ниже будет приведена только качественная трактовка.

Как показано на рис. 26.21, фермент иммобилизован в слое геля, располагающемся над ионоселективной мембраной. Если к раствору добавляют субстрат фермента, то он диффундирует в гелевый слой по градиенту концентрации; в геле фермент катализирует соответствующее превращение субстрата. Расположенный под слоем геля ИСПТ

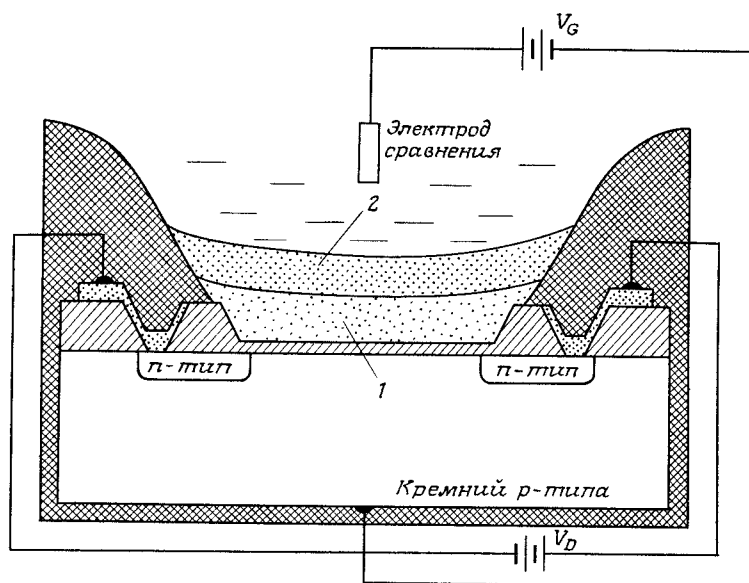


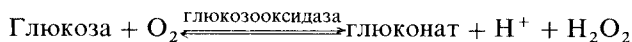
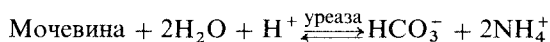
Рис. 26.21. Схема типичного ФПТ с ионоселективной мембраной (1) и слоем геля с иммобилизованным ферментом (2).

измеряет концентрацию продукта превращения субстрата или непрореагировавшего субстрата. В первом случае образующиеся в геле молекулы диффундируют во всех направлениях – как к ионоселективной мембране, так и из геля в раствор. Диффузия молекул к ионоселективной мембране – это не что иное, как повышение их концентрации на поверхности мембраны. В конце концов достигается равновесие, при котором устанавливается постоянная концентрация молекул на границе раздела гель – мембрана. Поскольку скорость реакции зависит от концентрации субстрата, эта установившаяся концентрация определяется концентрацией субстрата в растворе. Если же ИСПТ измеряет концентрацию оставшегося в гелевом слое и в растворе реагента (субстрата), то эта концентрация на границе раздела мембрана – гель будет понижаться, достигая в состоянии равновесия постоянного значения. Взаимосвязь между выходным сигналом ИСПТ и концентрацией субстрата в растворе сложна, а найти соответствующие математические выражения чрезвычайно трудно, поскольку они должны включать множество переменных, в том числе константы скорости всех реакций, коэффициенты диффузии каждого соединения, концентрацию иммобилизованного фермента, параметры ингибирования ферментативной реакции ее продуктом и т. д. Карас и другие [32] разработали модель, учитывающую большинство указанных переменных, а также влияние подвижного буфера в гелевом слое. Решение уравнений модели дало результаты, хорошо согласующиеся с экспериментальными данными для ФПТ, чувствительных к пенициллину и глюкозе.

26.6.2. Конструкции и характеристики ФПТ

За исключением чувствительного к мочеvine ФПТ, разработанного Даниельссоном и другими [27] и основанного на аммиачном газочувствительном ПТ, во всех других описанных до настоящего времени ФПТ используются ИСПТ с рН-чувствительной мембраной. В них в ходе ферментативной реакции образуются или расходуются ионы

Водорода в соответствии с уравнениями:



Выбор именно этих ферментных систем был обусловлен тем обстоятельством, что ИСПТ с рН-чувствительной мембраной не нуждаются в полимерной ионоселективной мембране; функции последней выполняет диэлектрик Si_3N_4 . Ферментосодержащие гелевые мембраны обычно получают иммобилизацией фермента в матрице из сшитых поперечными связями альбумина, поли(акриламида) или триацетилцеллюлозы.

Обычно используют кристалл с двумя затворами, причем один из ПТ является стандартом по отношению к ФПТ. На стандартный ИСПТ нанесена мембрана, не содержащая фермента, поэтому по чувствительности к рН и температуре он не отличается от ФПТ. Поскольку ФПТ и стандартный ПТ реагируют практически одинаково на изменение потенциала раствора, то необходимость в специальном электроде сравнения отпадает; обычно достаточно проволочного контакта с раствором. Таким образом, если измеряют разность между токами двух стоков, то результаты измерений (выходной сигнал) не зависят от рН раствора, температуры или флуктуаций тока (фона); регистрироваться будут только изменения рН внутри гелевой мембраны ФПТ, обусловленные ферментативной реакцией.

На рис. 26.22 представлена типичная временная характеристика отклика пенициллинселективного ФПТ на ступенчатое изменение концентрации субстрата [28]. Времена отклика таких сенсоров зависят прежде всего от толщины гелевой мембраны, так как субстрат и обнаруживаемые частицы должны диффундировать через мембрану. В работе [28], в которой применяли мембрану толщиной 50–100 мкм, 63% выходного сигнала обычно достигалось через 10–25 с. В других работах приводятся чуть большие временные постоянные, однако в этих случаях толщину мембраны контролировали не столь тщательно.

На рис. 26.23 представлен график зависимости того же самого пенициллинселективного ФПТ [28] от концентрации субстрата. Форма кривой отклика характерна для

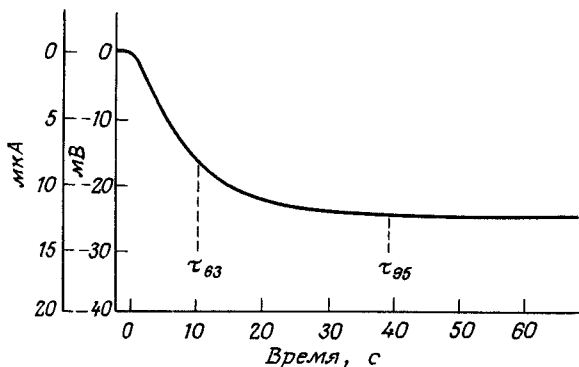
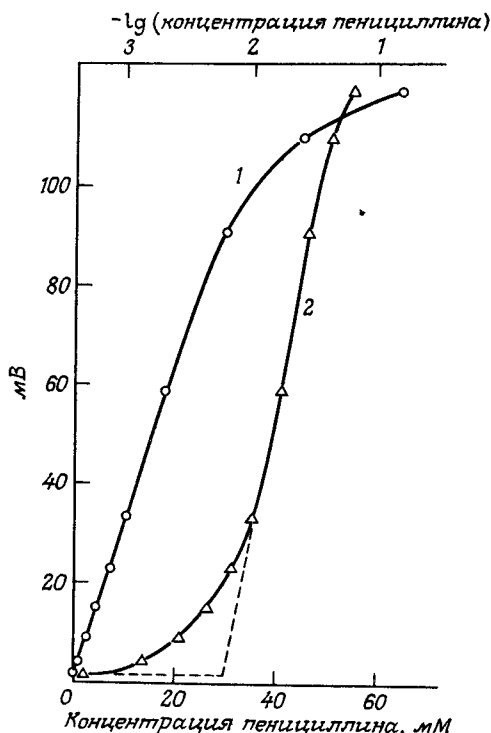


Рис. 26.22. Типичная дифференциальная временная характеристика чувствительного к пенициллину ФПТ при ступенчатом изменении концентрации пенициллина от 0 до 10 мМ в 0,02 М фосфатном буферном растворе, рН 7,2; 25°C (по данным [28]).

Рис. 26.23. Дифференциальный отклик чувствительного к пенициллину ФПТ (1—линейная шкала, 2—логарифмическая). Условия: 0,02 М фосфатный буферный раствор, рН 7,2; 37°C (по данным [28]).



всех описанных в литературе ФПТ. Обычно все они генерируют измеримый выходной сигнал при концентрации примерно от $1 \cdot 10^{-4}$ до $1 \cdot 10^{-2}$ М. Срок службы сенсоров, как правило, лимитируется устойчивостью фермента и поэтому зависит от природы последнего и от условий хранения. Согласно данным Караса и Джанаты [28], а также Мияхары и других [31], ФПТ для определения пенициллина, мочевины и ацетилхолина сохраняют свои характеристики в течение 1–2 месяцев, если в промежутках между экспериментами они хранятся в холодильнике.

Хотя, как уже упоминалось выше, пока все описанные в литературе ФПТ создавались на базе ИСПТ с рН-чувствительной мембраной, нет никаких оснований предполагать, что в ФПТ нельзя использовать другие ионоселективные мембраны. Предшествующее созданию гелевой мембраны осаждение полимерной ионоселективной мембраны всего лишь усложнит производство сенсоров. Любой ферментный электрод на основе макроИСЭ в принципе можно трансформировать в ферментный ИСПТ (ФПТ) и тем самым добиться отмечавшихся выше преимуществ.

26.7. Иммунохимически чувствительные полевые транзисторы

Большая молекулярная масса компонентов иммунохимической реакции (от 10 000 до 500 000) предъявляет специфические требования к электрохимическим свойствам сенсорной мембраны соответствующего электрода. В обычном ИСЭ селективность обуславливается тем, что из раствора в мембрану способны проникать (с высокой плотностью тока обмена) ионы только одного типа. Такая селективность достигается в свою очередь за счет включения в мембрану ионофоров, специфически связывающих ионы одного типа. Трудно представить себе, как можно было бы создать такую

мембрану, которая давала бы возможность проникать в мембрану (опять-таки с высокой плотностью тока) одним компонентам иммунохимической реакции и в то же время исключала бы проникновение других компонентов той же реакции. Иными словами, маловероятно, чтобы при разработке иммуноэлектрода мог быть использован механизм селективности ИСЭ. Очевидно, необходим иной механизм, позволяющий детектировать компоненты иммунохимической реакции электрохимическими методами, не требуя их проникновения в мембрану. Есть основания предполагать, что в принципе ПТ может удовлетворять этим требованиям, однако пока все попытки создания иммунохимически чувствительного ПТ были безуспешными.

26.7.1. Теория

Полевой транзистор по своей сути является устройством для измерения заряда. Действительно, любое изменение избыточного поверхностного заряда на внешней поверхности диэлектрика влечет за собой равное по величине и противоположное по знаку изменение заряда инверсионного слоя ПТ. Если граница раздела раствор-мембрана ХЧПТ идеально поляризована, т.е. заряд не может перейти через эту границу, то, как будет показано ниже, с помощью ХЧПТ можно измерять степень адсорбции заряженных частиц на границе раздела. Поскольку антитела, антигены и белки обычно представляют собой электрически заряженные молекулы, то поляризованный ХЧПТ можно использовать для измерения их неспецифической адсорбции на границе раздела мембрана-раствор. Чтобы придать поляризованному ХЧПТ селективность по отношению к данному антигену и таким образом создать так называемый иммунохимически чувствительный ПТ (ИМПТ), можно иммобилизовать на поверхности ХЧПТ антитела, специфичные по отношению к этому антигену (см. рис. 26.24). Тогда из всех находящихся в растворе молекул молекулы именно этого антигена будут специфично адсорбироваться на ХЧПТ, и сигнал последнего будет отражать степень адсорбции антигена.

Измерять описанным путем степень адсорбции заряженных частиц можно лишь в том случае, если заряд не может перейти границу раздела, т.е. если последняя является

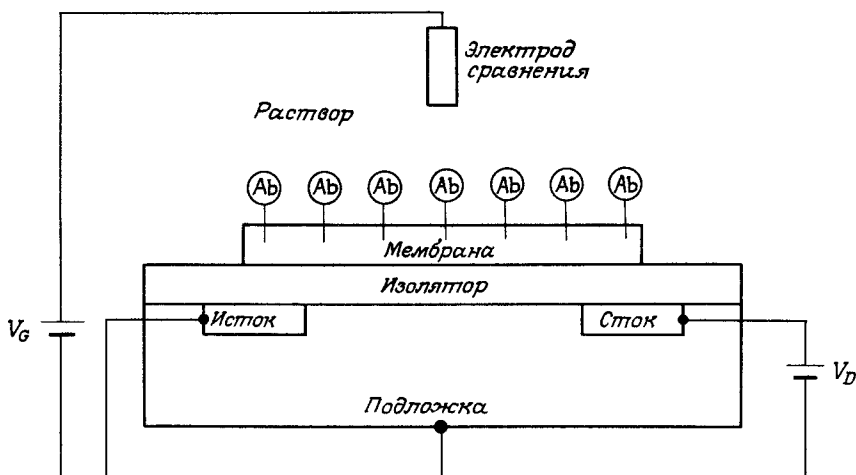


Рис. 26.24. Схема ИМПТ. Символом Ab обозначены антитела, иммобилизованные на границе раздела раствор-мембрана (по данным [33]).

пластиной идеального конденсатора. Емкость поляризованной границы раздела описывается теорией двойного электрического слоя [34] и обычно моделируется сочетанием двух конденсаторов C_G и C_H , где C_G – емкость диффузной части двойного слоя Гуи-Чапмена, а C_H – емкость части Гельмгольца двойного слоя. Следовательно, полная емкость C_{dl} равна

$$1/C_{dl} = 1/C_G + 1/C_H. \quad (26.25)$$

Таким образом, как показано на рис. 26.25, моделью электрической схемы ХЧПТ с идеально поляризованной границей раздела может служить комбинация последовательно соединенных C_G , C_H и C_0 , где C_0 – емкость диэлектрика. Слева от конденсатора Гельмгольца находится раствор, а справа от конденсатора диэлектрика – полупроводник. С помощью электрода сравнения между раствором и полупроводником создают разность потенциалов V_G . Процесс адсорбции заряженных молекул можно моделировать как перенос зарядов из раствора к поверхности транзистора. Такой перенос зарядов произойдет, если на короткое время замкнуть цепь переключателем; в это время источник тока будет выполнять роль переносчика зарядов. В результате адсорбции изменится заряд всех пластин конденсаторов, и установится новое равновесие. Для нас наибольший интерес представляет изменение заряда конденсатора C_0 , поскольку оно отражает изменение заряда Q_i инверсионного слоя ПТ и будет влиять на ток стока транзистора. Если в результате адсорбции заряженных молекул переносится заряд Q_{ads} , то изменение заряда на C_0 (Q_i) будет равно

$$Q_i = Q_{ads} [C_0 / (C_0 + C_{dl})]. \quad (26.26)$$

Следовательно, транзистору будет передана только часть адсорбированного заряда. Поскольку система в целом должна сохранять электронейтральность, то при адсорбции равный по величине и противоположный по знаку заряд должен перейти из раствора в инверсионный слой ПТ или в двойной слой. Согласно уравнению (26.26), часть зеркального заряда перейдет из раствора в двойной слой в виде ионов вместе с адсорбирующимися частицами. Эту часть заряда, отражающуюся в инверсионном слое ПТ, обозначают символом β . В рамках рассматриваемой модели

$$\beta = Q_i / Q_{ads} = C_0 / (C_0 + C_{dl}). \quad (26.27)$$

В случае типичного ХЧПТ C_0 равно приблизительно $0,03 \text{ мкФ/см}^2$. При концентрации электролита $0,1 \text{ М}$ емкость двойного слоя C_{dl} равна примерно 10 мкФ/см^2 . Таким образом, согласно рассматриваемой модели, только $0,3\%$ заряда адсорбирующихся молекул отразится в инверсионном слое ПТ. В более разбавленных растворах C_{dl} будет

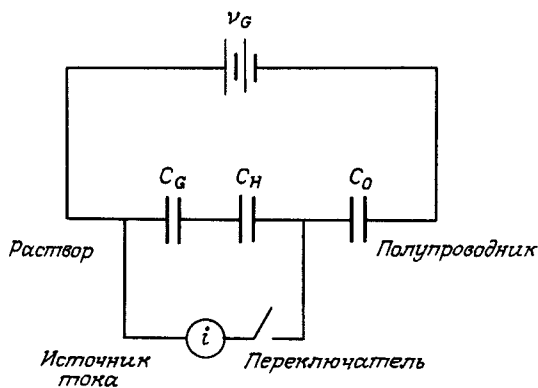


Рис. 26.25. Электрическая модель измерения адсорбции заряда с помощью ХЧПТ (по данным [33]).

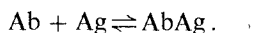
меньше и соответственно возрастет β . С другой стороны, при адсорбции больших молекул, к числу которых относятся иммунореагенты, адсорбированный заряд будет располагаться не строго на границе раздела, а на некотором расстоянии от нее (около 1–10 нм). Поэтому доля заряда, отражающаяся в инверсионном слое ПТ, будет еще меньшей и по наиболее надежным оценкам составит величину порядка 10^{-4} .

Обратившись к уравнениям (26.15) и (26.16), устанавливающим зависимость между током стока ХЧПТ и потенциалом границы раздела раствор–мембрана, нетрудно видеть, что для описания химического отклика ИМПТ необходимо найти взаимосвязь между адсорбированным зарядом и поверхностным потенциалом $\phi_{\text{sol-mem}}$. Последний представляет собой не что иное, как частное от деления индуцированного в инверсионном слое изменения заряда на емкость конденсатора:

$$\phi_{\text{sol-mem}} = Q_i / C_0 = \beta Q_{\text{ads}} / C_0. \quad (26.28)$$

Подставив это выражение в уравнения (26.15) и (26.16), получим уравнения, описывающие отклик поляризованного ХЧПТ.

Связывание антигена Ag с антителом Ab с образованием комплекса AbAg на границе раздела можно описать простым уравнением



Эта реакция характеризуется константой равновесия K :

$$K = [\text{AbAg}] / [\text{Ab}][\text{Ag}]. \quad (26.29)$$

Можно показать, что обусловленное связыванием полное изменение заряда Q_i на границе раздела равно

$$Q_i = \beta Q_{\text{ads}} = \beta z F \frac{K [\text{Ag}][\text{S}]}{1 + [\text{Ag}]}, \quad (26.30)$$

где z – ионный заряд антигена, а $[\text{S}]$ – поверхностная концентрация связывающих центров (поверхностная концентрация иммобилизованных антител до связывания с антигенами). Подстановкой этого выражения в уравнение (26.28) получим

$$\phi_{\text{sol-mem}} = \frac{\beta z F K [\text{Ag}][\text{S}]}{C_0 (1 + [\text{Ag}])}. \quad (26.31)$$

Уравнение (26.31) позволяет предсказать предел обнаружения антигенов с помощью ИМПТ и диапазон определяемых содержаний. Если принять, что константа равновесия лежит обычно в диапазоне от 10^5 до 10^9 [35], β равно 10^{-4} , поверхностная концентрация иммобилизованных антител равна 1 молекуле на 10 нм^2 , заряд антигена равен пяти элементарным зарядам, а минимальный измеримый сигнал – 10 мВ, то предел обнаружения должен составить от 10^{-7} до 10^{-11} М. Аналогично можно рассчитать, что концентрация антигена, при которой достигается покрытие 90% поверхности, равна 10^{-4} – 10^{-8} М. Отсюда следует, что теоретический диапазон отклика ИМПТ равен трем порядкам. Этот диапазон можно расширить, если иммобилизовать смесь антител с различными константами равновесия.

Аналогичные уравнения можно вывести и для сенсора, в котором на границе раздела иммобилизованы антигены. Такой сенсор будет определять концентрацию специфических антител.

Обратимость реакции связывания между антигеном и антителом определяет и обратимость сенсора. Если связывание необратимо, то при каждом последующем определении сенсор будет способен измерить лишь более высокие концентрации, чем в предыдущем. Очевидно, этот фактор будет ограничивать применение сенсоров во многих ситуациях, например при контроле концентраций иммунореагентов *in vivo* в

реальном масштабе времени. Впрочем, в экспериментах *in vitro* иммунные комплексы можно разрушить химической обработкой (например, промыв раствором с высокой ионной силой) и таким образом обеспечить многократное использование сенсоров.

Пока что принималось, что граница раздела раствор–мембрана идеальна, т. е. она представляет собой идеальный конденсатор с нулевым током утечки. Однако в реальных ситуациях идеальных границ раздела не существует, поэтому моделью границы раздела должно быть сочетание конденсатора C_{dl} с параллельно включенным резистором с сопротивлением переносу заряда R_{ct} . Указанное отклонение от идеального поведения означает, что в ИМПТ любое обусловленное адсорбцией заряженных частиц изменение заряда границы раздела не останется распределенным между модельными конденсаторами (как это принималось выше); напротив, разделенные заряды будут утекать через границу раздела раствор–мембрана и экспоненциально затухать с постоянной времени, равной $R_{ct}C_{dl}$. Чтобы при типичной границе раздела с $C_{dl} = 10 \text{ мкФ/см}^2$ постоянная времени была равна 100 с, R_{ct} должно быть не менее $10^7 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$. На практике такое сопротивление заряду встречается крайне редко, если только не приняты особые меры для предотвращения любого переноса заряда через границу раздела. Следовательно, теории ИМПТ удастся проверить экспериментально только в том случае, если будет найден материал для мембраны с сопротивлением переносу заряда не менее $10^7 \text{ Ом}\cdot\text{см}^2$.

В этом случае удастся создать ИМПТ с идеально поляризованной границей раздела, способный определять концентрации иммунореагентов в растворах и имеющих очень низкий предел обнаружения и широкий диапазон отклика. Специфичность ИМПТ тогда будет определяться специфичностью применяемых иммунореагентов, которую пока что превзойти не удалось.

26.7.2. Практические попытки разработки ИМПТ

При изучении поляризованных ХЧПТ применяли три типа мембран [6, 33]: 1) тонкие мембраны из электропроводных металлов, например золота или платины; 2) толстые мембраны из электропроводных гидрофобных полимеров, например поливинилхлорида (ПВХ) или полистирола; 3) тонкие мембраны из диэлектрика, например пленки стеарата кадмия Лэнгмюра–Блоджетта. Ниже обсуждаются результаты изучения мембран этих трех типов.

В электрохимических экспериментах, в которых необходима поляризованная граница раздела, часто используют некоторые металлы, в частности золото, платину и ртуть. В большинстве электрохимических методов анализа, например в циклической вольтамперометрии или полярографии, электрод считается поляризованным, если фоновый ток в отсутствие электроактивных веществ мал по сравнению с током в присутствии изучаемых электроактивных веществ. Это требование гораздо менее строго, чем требование, предъявляемое к поляризованному ХЧПТ. Поскольку металлы обладают электронной электропроводностью, то даже небольшая концентрация любых электроактивных молекул в растворе может способствовать пересечению электронами границы раздела. Для достижения сопротивления переносу заряда, обеспечивающего возможность определять изменения заряда на границе раздела с помощью ХЧПТ, все электроактивные частицы должны быть полностью удалены из раствора. Показано, например, что иодид-ионы легко адсорбируются на ХЧПТ с затвором из металлического золота [36]. Растворы иммунореагентов или белков всегда содержат то или иное количество электроактивных примесей, и их сопротивление переносу заряда слишком мало, чтобы можно было измерить степень адсорбции заряженных молекул [6]. Поскольку такие примеси всегда присутствуют в растворе любого иммунореагента и поскольку они снижают сопротивление переносу

заряда любого металлического электрода, можно сделать обоснованный вывод, что металлические пленки не пригодны для изготовления мембран ИМПТ.

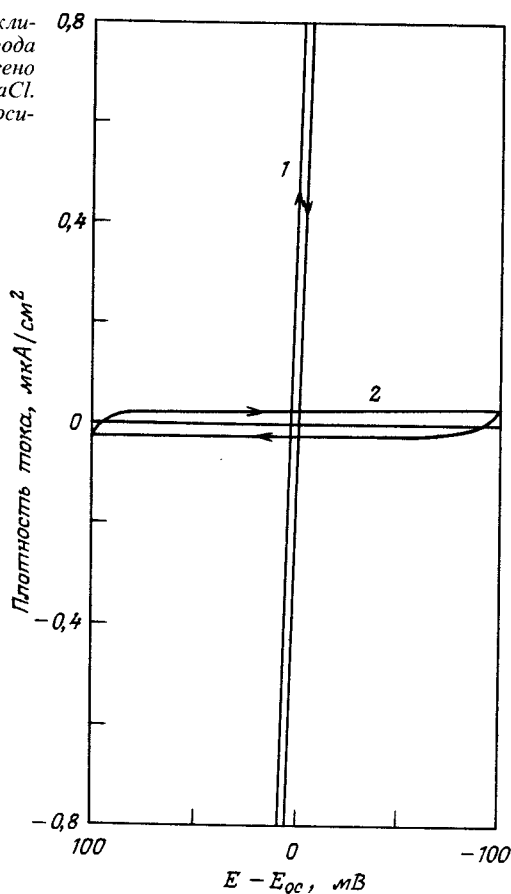
Опубликовано несколько сообщений об иммунохимических электродах с толстыми полимерными мембранами. Так, Аизава и другие [37] описали иммуноэлектрод, чувствительный к антителам против возбудителей сифилиса; мембрана этого электрода состояла из ПВХ, холестерина, кардиолипина и фосфатидилхолина. Можно было предполагать, что не содержащая ионофоров и поэтому неспособная индуцировать ионный поток через границу раздела полимерная мембрана обеспечит идеальную поляризацию границы раздела, в то время как электропроводность системы в целом будет достаточно высокой для измерений.

Следует отметить, что толстая мембрана (100 мкм), изготовленная из полимера, который принято считать диэлектриком, над затвором ХЧПТ может оказаться электропроводной. Дело в том, что входное сопротивление транзистора равно приблизительно 10^{15} Ом, поэтому любая мембрана с сопротивлением, на порядок меньшим, будет вести себя как проводящий элемент затвора.

Коллинз и Джаната [38] показали, что описанная в работе [37] мембрана реагирует на изменения концентраций многих небольших неорганических ионов в растворе и что через эту мембрану может проходить постоянный ток. Следовательно, граница раздела этой мембраны и раствора не поляризована. Аналогичные результаты были получены и при изучении мембран, изготовленных только из полимеров (ПВХ, полистирола, блоксополимера полистирол-полибутадиен) [6]. Оказалось, что по сопротивлению переносу заряда такие мембраны располагаются между хорошими ионоселективными мембранами и поляризованными электродами. Смешанный потенциал границы раздела определяется потоками нескольких ионов. Высказывалось предположение, что наблюдаемый отклик на иммунореагенты обусловлен совместным эффектом адсорбции белков и ионного обмена, изменяющим смешанный потенциал [38]. Так как адсорбция белка могут способствовать иммобилизованные иммунореагенты, то легко сделать некорректное заключение о непосредственной связи между выходным сигналом устройства и иммунохимической реакцией. В действительности же выходной сигнал является вторичным явлением, а изменение потенциала обусловлено многочисленными неорганическими ионами. Даже ничтожно малое изменение концентрации любого из этих ионов вызовет изменение смешанного потенциала на границе раздела. Следовательно, основная цель разработки высокоспецифичных иммунохимических сенсоров остается недостижимой, поскольку сенсор, по сути дела, оказывается абсолютно неспецифичным. До настоящего времени не найдено полимера, остающегося идеально поляризованным в водных растворах.

В работе [6] изучена возможность создания идеально поляризованных границ раздела на основе пленок Лэнгмюра-Блоджетта [39] из стеарата кадмия. При однократном осаждении на подложку из границы раздела воздух-вода образуется монослойная пленка Лэнгмюра-Блоджетта. Граница раздела воздух-вода ориентирует молекулы стеарата кадмия так, что гидрофильные концевые группы располагаются на поверхности воды, а гидрофобные углеводородные цепи вытягиваются над этой поверхностью в воздух почти под прямым углом к поверхности. Осаждению монослоя предшествует физическое сжатие, поэтому углеводородные цепи образуют довольно плотную упаковку. Каждый последующий осаждаемый монослой стеарата кадмия обычно ориентируется по отношению к предыдущему под углом 180° так, что в соседних слоях молекулы располагаются по принципу «голова к хвосту». В силу такой плотной упаковки слоев ориентированных углеводородных цепей пленки Лэнгмюра-Блоджетта представляются весьма перспективными для создания идеально поляризованных границ раздела. Пленка Лэнгмюра-Блоджетта из двух монослоев представляет собой слой плотно упакованных углеводородных цепей толщиной $\sim 4,5$ нм.

Рис. 26.26. Результаты изучения методом циклической вольтамперометрии алюминиевого электрода (1) и алюминиевого электрода, на который нанесено 11 монослоев стеарата кадмия (2), в 0,1 М NaCl. E_{oc} — напряжение в режиме холостого хода относительно электрода сравнения Ag/AgCl.



Энергетический барьер переноса молекул воды или ионов через такую пленку должен быть чрезвычайно высоким; следовательно, если структура пленки совершенна, то граница раздела должна быть почти идеально поляризованной.

Пленки Лэнгмюра–Блоджетта из стеарата кадмия на алюминиевом электроде (11 монослоев, толщина 27,5 нм) действительно повышают сопротивление границы раздела переносу заряда, но далеко не в той степени, какая необходима для создания идеально поляризованной границы раздела ([6], рис. 26.26). Сила тока, способного пересекать мембрану, уменьшилась примерно на три порядка, однако наклон кривой зависимости ток–напряжение показал, что электрическое сопротивление (как мера сопротивления переносу заряда) составило лишь $2 \cdot 10^3 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$, что намного меньше необходимой величины $10^7 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$. Высказывалось предположение, что изучавшиеся пленки имеют дефекты или межзеренные границы, нарушающие идеальную плотную упаковку углеводородных цепей и таким образом пропускающие заряженные частицы. Эта работа, однако, носила характер предварительного изучения свойств пленок в водных растворах, и в будущем, возможно, удастся оптимизировать системы на основе пленок Лэнгмюра–Блоджетта.

Из сказанного следует, что неудачи попыток создать иммунохимически чувствительный сенсор (электрод или ПТ) объясняются тем, что пока еще не найдена идеально поляризованная граница раздела. Многочисленные сообщения об иммунохимических

потенциометрических сенсорах следует считать экспериментальными артефактами, которые можно объяснить особенностями кинетики процессов на электродах, т.е. изменением смешанного потенциала на неидеально поляризованных границах раздела. По мнению авторов [33], представляется крайне маловероятным, чтобы удалось найти границу раздела с сопротивлением переносу заряда не менее $10^7 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$; следовательно, маловероятно и создание потенциометрического иммунохимического сенсора.

26.8. Газочувствительные полевые транзисторы

26.8.1. Чувствительный к водороду ДЗПТ с палладиевым затвором

Газочувствительный сенсор на основе ПТ впервые был описан Лундстремом и другими [40]. Этот сенсор был модификацией обычного ДЗПТ, в котором между стоком и истоком транзистора на поверхность диэлектрика был нанесен металлический затвор; его главное отличие от других ДЗПТ заключалось в том, что металлический затвор был изготовлен из палладия, обладающего каталитической активностью. Переходные металлы, в том числе палладий и платина, уникальны в двух отношениях: во-первых, они катализируют разложение молекул водорода до атомов на границе раздела металл-газ, где образующиеся атомы водорода затем адсорбируются, и, во-вторых, атомы водорода растворимы в палладии и платине и могут, как это схематично показано на рис. 26.27, диффундировать от границы раздела металл-газ в металл затвора. Лундстрем [41], а также Лундстрем и Седерберг [42] показали, что часть растворенных в металле затвора атомов водорода адсорбируется на границе раздела металл-диэлектрик. Индуцированный адсорбированными атомами водорода дипольный момент вносит свой вклад в изменение работы выхода металлического затвора. Как показывают уравнения (26.13) и (26.14), ток стока ДЗПТ зависит от разности работ выхода металла затвора и полупроводника. Следовательно, изменение работы выхода металла (платины или палладия) затвора будет индуцировать изменение тока стока транзистора; таким образом, изменение тока стока оказывается непосредственно связанным с концентрацией молекул водорода в газе, окружающей область затвора транзистора.

В присутствии кислорода (или других «окисляющих» газов) адсорбированные атомы водорода могут вступать в химические реакции; результатом будет обеднение поверхности атомами водорода (см. рис. 26.27). Поскольку атомы водорода, адсорбированные на границах раздела металл-диэлектрик и металл-газ, находятся в равновесии, то введение в систему кислорода снижает величину потенциала двойного заряженного слоя. Следовательно, H_2 -чувствительные ДЗПТ можно использовать и как чувствительные к кислороду сенсоры, если парциальное давление водорода поддерживается на постоянном уровне [41].

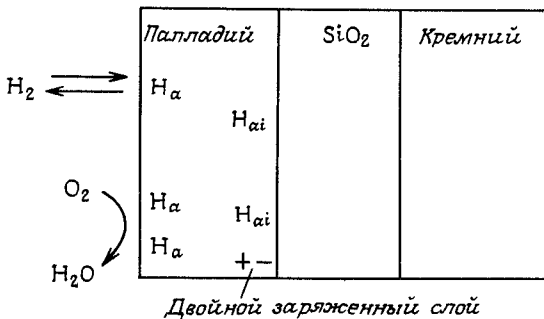


Рис. 26.27. Схематическое представление механизма чувствительности ДЗПТ с палладиевым затвором к водороду и кислороду. H_a — адсорбированные атомы водорода, H_b — атомы водорода, растворенные в толще палладиевого слоя, H_{ai} — атомы водорода, адсорбированные на границе раздела металл-диэлектрик и вносящие вклад в двойной заряженный слой.

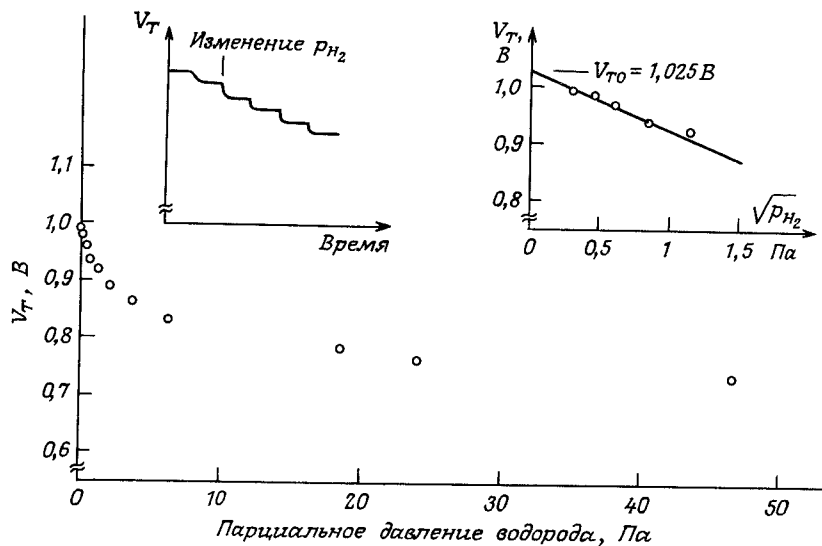


Рис. 26.28. Отклик ДЗПТ с палладиевым затвором на различную концентрацию водорода в воздухе. V_{T0} – пороговое напряжение в условиях, когда палладиевая пленка совершенно свободна от водорода. Температура транзистора 120°C (по данным [43]).

На рис. 26.28 представлен типичный отклик транзистора со структурой Pd-МОП на концентрацию водорода в воздухе [43]. Температуру транзистора поддерживали на уровне 120°C ; только при этом условии обеспечивается удовлетворительное время отклика сенсора. В работе Лундстрема [41] сообщалось, что предел обнаружения водорода равен примерно $3 \cdot 10^{-5}$ Па в инертной атмосфере и $5 \cdot 10^{-4}$ Па в воздухе. Несколько меньшая чувствительность сенсора в воздухе объясняется снижением концентрации адсорбированного водорода в результате взаимодействия с атмосферным кислородом.

Показано, что ДЗПТ с палладиевым затвором чувствительны и к другим соединениям, содержащим водород, например к аммиаку и сероводороду [41], а также к метану и бутану [44]. Считается, что металл затвора катализирует разложение таких соединений до атомарного водорода и других веществ. Механизм чувствительности сенсора к таким газам не отличается от механизма чувствительности к водороду и включает образование двойного заряженного слоя атомов водорода на границе раздела металл–диэлектрик. Селективность сенсоров по отношению к водородсодержащим газам является результатом высокой растворимости водорода в палладии и низкой растворимости всех других веществ.

Опубликовано несколько сообщений о ДЗПТ с палладиевым затвором, чувствительным к газообразному монооксиду углерода. Для достижения чувствительности к газам, не содержащим водород, необходимо придать металлу затвора «дырчатую», или пористую структуру, позволяющую молекулам газа проникать к границе раздела металл–диэлектрик; в противном случае газы могут контактировать с последним только за счет растворимости в металле и диффузии через него. Лундстрем и другие [42] описали ДЗПТ с пористым палладиевым затвором, а Крей и другие [45] – ДЗПТ с палладиевым затвором, в котором фотолитографически сформированы отверстия, позволяющие газу контактировать с границей раздела металл–диэлектрик. На рис. 26.29 представлена схема поперечного сечения сенсора на основе ДЗПТ с палла-

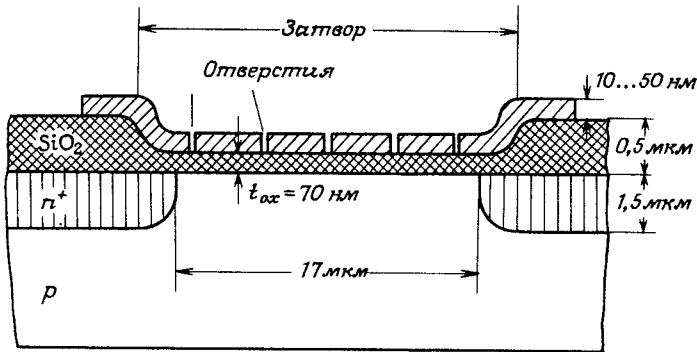


Рис. 26.29. Поперечное сечение ДЗПТ с палладиевым затвором, в котором фотолитографически проделаны отверстия (по данным [45]).

диевым затвором с отверстиями. Чувствительность сенсора к СО составляет около 75 мВ при давлении 0,1 мм рт.ст., а максимальный сигнал — около 150 мВ. Как и ожидалось, этот сенсор чувствителен также к водороду, метану, бутану и другим водородсодержащим газам. Крей и другие [45] показали, что чувствительность сенсора к водороду можно снизить по меньшей мере на порядок, если на палладиевую поверхность нанести тонкую алюминиевую пленку (толщиной 20 нм). При этом чувствительность по отношению к СО снижается всего лишь в 2 раза. Очевидно, алюминий затрудняет диффузию водорода в палладий.

26.8.2. ГПТ с висящим затвором

Описанные выше сенсоры на основе ПТ с затвором из переходных металлов селективны по отношению к водородсодержащим соединениям, так как только водород заметно растворим в металле затвора. К сожалению, селективность к иным газам у других металлов обнаружить не удалось. Для придания чувствительности и селективности к другим газам необходимы затворы особой конструкции, которые давали бы доступ газам к границе раздела металл — диэлектрик и которым в принципе можно было бы придать селективность путем той или иной модификации поверхностей границ раздела.

Стенберг и Даленбек [46] описали ДЗПТ, в котором под полисиликоновым затвором диэлектрик частично вытравлен, благодаря чему между небольшой частью затвора и кремнием создается воздушный зазор. В работе [47] нами описан ГПТ с «висящим затвором»; как показано на рис. 26.30, в нем платиновый затвор висит над всей областью затвора транзистора. Ряд отверстий в платиновом затворе дает доступ газу к воздушному зазору между металлом и диэлектриком. По своей конструкции этот сенсор близок ИСПТ с висящей сеткой, описанному в разд. 26.5.4.

Зазор между металлом и диэлектриком можно рассматривать как дополнительный диэлектрик с диэлектрической проницаемостью, близкой к 1. Если в зазор проникают полярные молекулы, то диэлектрическая проницаемость воздушного зазора изменяется незначительно. Напротив, если такие молекулы адсорбируются на поверхности металла или диэлектрика, сохраняя при этом какую-либо преимущественную ориентацию, то возникает дипольный потенциал χ , вносящий свой вклад в поверхностный потенциал:

$$\chi = \frac{1}{\epsilon_0} \sum_i N_i \mu_i \quad (26.32)$$

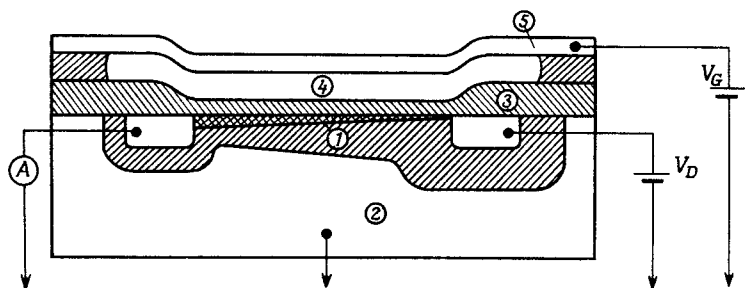


Рис. 26.30. Поперечное сечение ГПТ с висящим затвором. 1—инверсионный слой; 2—кремниевая подложка; 3—диэлектрик; 4—воздушный зазор; 5—висящий палладиевый затвор (по данным [47]).

Здесь N_i —плотность адсорбированных молекул; μ_i —вертикальная составляющая их дипольного момента (не путать с химическим потенциалом, обозначаемым тем же символом); ϵ_0 —диэлектрическая проницаемость вакуума. Наряду с приложенным к затвору напряжением V_G этот потенциал можно рассматривать как источник напряжения. Следовательно, изменение плотности адсорбированных молекул приведет к изменению суммарного электрического поля и таким образом к изменению тока стока. В режиме постоянного тока стока это изменение поверхностного потенциала можно контролировать непосредственно.

Висящую металлическую сетку формируют на кремниевой пластине, на которой предварительно уже изготовлено множество ПТ без металлизации затворов. Висящую сетку создают, проделывая множество отверстий в платиновой пленке, нанесенной на тонкую алюминиевую пластину. Затем через отверстия алюминий вытравливают из-под пленки, после чего остается сетка, висящая над затвором ПТ. Обычно алюминиевая пластина имеет толщину 100 нм, поэтому и образующийся воздушный зазор

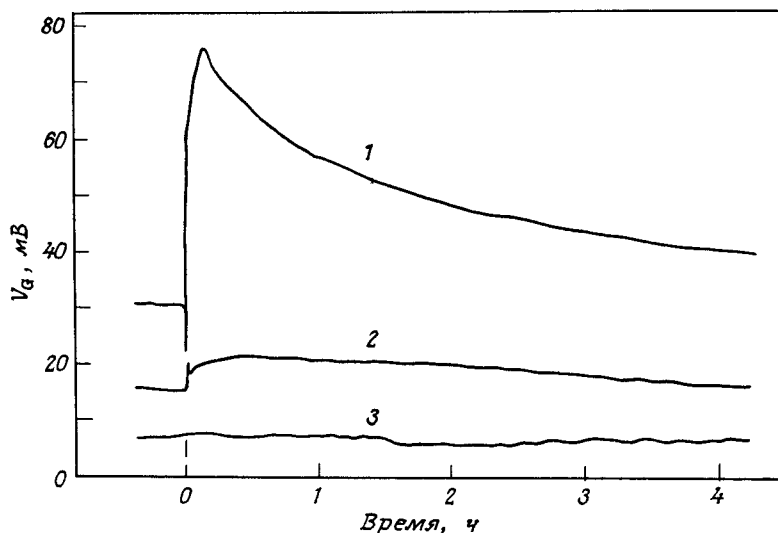


Рис. 26.31. Отклик ГПТ с висящим затвором на введение в поток азота 5 мкл метанола (1), метилхлорида (2), н-гептана (3) (по данным [47]).

имеет такую же высоту. Диаметр отверстий, отстоящих одно от другого на 10 мкм, равен 5 мкм. Процесс изготовления таких устройств детально описан в работе [47].

Химический отклик сенсора сначала изучали в потоке, вводя 5 мкл исследуемого вещества в камеру-испаритель объемом 5 мл; из камеры вещество вымывалось током газа-носителя и направлялось на ГПТ. Кривые отклика представлены на рис. 26.31. Отсутствие отклика на пентан и другие неполярные молекулы подтверждает концепцию об изменении поверхностного потенциала. В случае метанола и метилхлорида первоначальный быстрый отклик сопровождается сильным, но более медленным выходным сигналом; причиной этого явления могут быть различные кинетика адсорбции и(или) ориентация молекул на платине и(или) диэлектрике (нитриде кремния). В настоящее время эта проблема изучается. Очень большое время затухания сигнала до величины фона обусловлено медленной десорбцией из стенок системы ввода газа. В последующих экспериментах сенсор был подсоединен к выходу колонки газового хроматографа; в этом случае временные характеристики сенсора улучшились.

ГПТ с висящим затвором выгодно отличается от ГПТ с палладиевым затвором тем, что в первом случае селективность сенсора не ограничивается только одним веществом. В том виде, в каком ГПТ с висящим затвором существуют сейчас, они чувствительны к большинству полярных молекул. В настоящее время изучаются пути химической модификации поверхностей элементов затвора, которые, возможно, позволят придать этим новым сенсорам ту или иную степень селективности.

26.9. Заключение

В этой главе мы рассмотрели теорию химически чувствительных полевых транзисторов нескольких типов и проблемы, связанные с их применением. Целью авторов являлся не детальный обзор литературы, а обсуждение важнейших направлений исследований в этой области.

Из различных ХЧПТ наибольшие успехи достигнуты в области ионоселективных ПТ. Отчасти это обусловлено доступностью ионоселективных мембран, широко изучавшихся с точки зрения их применения в ИСЭ. ИСПТ следует рассматривать как дополнение к ИСЭ, причем в ряде конкретных областей применения ИСПТ может иметь определенные преимущества перед ИСЭ. Преобразование общего сопротивления *in situ* позволяет обходиться без громоздких экранированных кабелей при низком уровне шума. Это преимущество сенсоров на основе ИСПТ, а также их миниатюрность делают ИСПТ идеальным инструментом для экспериментов *in vivo*, например для контроля концентраций электролитов в организме, когда важную роль играют размеры как самого сенсора, так и соединяющих кабелей. Твердотельная структура сенсоров ИСПТ (в особенности отсутствие необходимого для ИСЭ внутреннего раствора) делает ИСПТ небольшим, легким и достаточно прочным. Поскольку размер каждого ПТ на поверхности кристалла может быть очень малым, то принципиально возможно создание сенсоров, способных одновременно определять несколько различных веществ. Для этого, однако, необходимо разработать метод осаждения мембраны, позволяющий надежно нанести на один кристалл с микросхемой несколько небольших мембран, располагающихся очень близко одна от другой. Поскольку сенсоры изготавливают на полупроводниковой подложке, то не представляет затруднений создание дополнительной схемы обработки сигнала, выполняющей, например, мультиплексирование или аналого-цифровое преобразование сигнала. Наконец, поскольку микросхемы производятся тысячами одновременно на одной кремниевой пластине, их стоимость в принципе может быть очень малой. Снижению цены и трудоемкости производства ИСПТ препятствует отсутствие автоматических способов осаждения мембраны и герметизации.

Химически чувствительные полевые транзисторы чрезвычайно интересны и с той точки зрения, что с их помощью многие вещества можно определять на базе таких механизмов, которые ранее было трудно или даже невозможно реализовать. В частности, поляризованные ХЧПТ в принципе позволяют определять изменения поверхностного заряда, который может быть индуцирован специфическими взаимодействиями иммунореагентов на поверхностях. К сожалению, разработке сенсоров такого типа может препятствовать необходимость создания почти идеально поляризованной границы раздела. Другим важным направлением является разработка газовых сенсоров на основе ПТ, в которых используются такие механизмы чувствительности к газам, какие не удавалось реализовать ранее в других аналитических устройствах.

Хотя химически чувствительные полевые транзисторы только начинают изучаться, и в этом направлении еще предстоит проделать огромную работу, химические сенсоры этого типа представляются весьма перспективными с точки зрения их потенциальных преимуществ перед сенсорами других типов. Кроме того, ХЧПТ впервые позволили использовать новые механизмы определения многих веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Zemel J. N.* Ion-sensitive field effect transistors and related devices. *Anal. Chem.*, **47**, 255A-66A (1975).
2. *Janata J., Huber R. J.* Ion sensitive field effect transistors. *Ion-SEL. Electrode Rev.*, **1**, 31-78 (1979).
3. *Muller R. S., Kamins T. I.* Device electronics for integrated circuits. John Wiley, New York, 1977.
4. *Sze S. E.* Physics of semiconductor devices. 2nd edition, John Wiley, New York, 1981.
5. *Colclaser R. A.* Microelectronics: processing and device design. John Wiley, New York, 1980.
6. *Blackburn G. F.* Molecular adsorption measurement with chemically sensitive field effect transistors. Ph.D. Dissertation, University of Utah, USA, 1983.
7. *Ho N. J., Kratochvil J., Blackburn G. F., Janata J.* Encapsulation of polymeric membrane-based ion-selective field effect transistors. *Sensors and Actuators*, **4**, 413-21 (1983).
8. Ion-selective electrodes in analytical chemistry. Freiser H. (ed.). Vol. 1. Plenum Press, New York, 1978.
9. Ion-selective electrodes in analytical chemistry. Freiser H. (ed.). Vol. 2. Plenum Press, New York, 1980.
10. *Koryta J.* Ion-selective electrodes. Cambridge University Press, 1975.
11. *Bergveld P.* Development of an ion-selective solid-state device for neuro-physiological measurements. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-17**, 70-1 (1970).
12. *Matsuo T., Esashi M., Iinuma K.* Biomedical active electrode utilizing field-effect of solid state device (1). Digest of Joint Meeting of Tohoku Sections of I. E. E. J., October 1971.
13. *Abe H., Esashi M., Matsuo T.* ISFET's using inorganic gate thin films. *IEEE Trans. Electron Devices*, **ED-26**, 1939-44 (1979).
14. *Akiyama T., Ujihira Y., Okabe Y., Sugano T., Niki E.* Ion-sensitive field-effect transistors with inorganic gate oxide for pH sensing. *IEEE Trans. Electron Devices*, **ED-29**, 1936-41 (1982).
15. *Buck R. P., Hackleman D. E.* Field effect potentiometric sensors. *Anal. Chem.*, **49**, 2315-21 (1977).
16. *Esashi M., Matsuo T.* Integrated micro-multi-ion sensor using field effect of semiconductor. *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **BME-25**, 184-92 (1978).
17. *Band D. M., Kratochvil J., Poole Wilson P. A., Treasure T.* Relationship between activity and concentration of plasma potassium. *Analyst*, **103**, 246-51 (1978).
18. *Griffiths G. H., Moody G. J., Thomas J. D. R.* An investigation of the optimum composition of poly(vinyl chloride) matrix membranes used for selective calcium-sensitive electrodes. *Analyst*, **97**, 420-27 (1972).
19. *McBride P. T., Janata J., Comte P. A., Moss S. D., Johnson C. C.* Ion-selective field-effect transistors with polymeric membranes. *Anal. Chim. Acta*, **101**, 239-45 (1978).
20. *Pungor E., Toth K., Havas J.* Theory and application of heterogenous rubber membrane electrodes in the determination of some ions. *Mikrochim. Acta*, **1966**, 689-98 (1966).
21. *Shiramizu B. T., Janata J., Moss S. D.* Ion-selective field effect transistors with heterogeneous membranes. *Anal. Chim. Acta*, **108**, 161-7 (1979).
22. *Janata J.* Chemically sensitive field effect transistors. In *Ion-selective electrodes in analytical chemistry*, Freiser H. (ed.), pp. 107-74. Plenum Press, New York, 1980.
23. *McKinley B. A., Saffle J., Jordan W. S., Janata J., Moss S. D., Westenskow D. R.* In vivo continuous monitoring of K^+ in animals using ISFETs. *Med. Instrum.*, **14**, 93-7 (1980).
24. *Blackburn G. F., Janata J.* The suspended mesh ion selective field effect transistor. *J. Electrochem. Soc.*, **129**, 2580-4 (1982).

25. *Guilbault G.G.* Immobilized enzymes as analytical reagents. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **7**, 85–98 (1982).
26. *Caras S.D., Petelenz D., Janata J.* pH based enzyme potentiometric sensors. Part 2. Glucose sensitive field effect transistor. *Anal. Chem.*, **57**, 1920–3 (1985).
27. *Danielsson B., Lundstrom I., Winquist F., Mosbach K.* On a new enzyme transducer combination: the enzyme transistor. *Anal. Lett.*, **B12**, 1189–99 (1979).
28. *Caras S.D., Janata J.* Field effect transistor sensitive to penicillin. *Anal. Chem.*, **52**, 1935–7 (1980).
29. *Caras S.D.* pH based enzyme potentiometric sensors. Part 3. Penicillin sensitive field effect transistor. *Anal. Chem.*, **57**, 1924–5 (1985).
30. *Hanazoto Y., Shiono S.* Bioelectrode using two hydrogen sensitive field effect transistors and a platinum wire pseudo reference electrode. In Proceedings of the international meeting on chemical sensors, Fukuoka, Japan, September 19–22, 1983, pp. 513–8. Elsevier, New York, 1983.
31. *Miyahara Y., Matsu F., Moriizumi T.* Micro-enzyme sensors using semiconductor and enzyme-immobilization techniques. In Proceedings of the international meeting on chemical sensors, Fukuoka, Japan, September 19–22, 1983, pp. 513–8. Elsevier, New York, 1983.
32. *Caras S.D., Janata J., Saupe D., Schmitt K.* pH based enzyme potentiometric sensors. Part 1. Theory. *Anal. Chem.*, **57**, 1917–20 (1985).
33. *Janata J., Blackburn G.F.* Immunochemical potentiometric sensors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **428**, 286–92 (1984).
34. *Bockris J.O'M., Reddy A.K.N.* Modern electrochemistry, Vol. 2. Plenum Press, New York, 1970.
35. *Eisen H.N.* Immunology, an introduction to molecular and cellular principles of the immune response. Harper and Row, New York, 1974.
36. *Cohen R.M., Janata J.* Measurement of excess charge at polarized electrodes with field effect transistors. Part 1. Direction determination of Esin–Markov coefficient. *J. Electroanal. Chem.*, **151**, 33–9 (1983).
37. *Aizawa M., Kato S., Suzuki S.* Immunoresponsive membrane. I. Membrane potential change associated with an immunochemical reaction between membrane-bound antigen and free antibody. *J. Membrane Sci.*, **2**, 125–32 (1977).
38. *Collins S., Janata J.* A critical evaluation of the mechanism of potential response of antigen polymer membranes to the corresponding antiserum. *Anal. Chim. Acta*, **136**, 93–9 (1982).
39. *Gaines G.L.* Insoluble monolayers at liquid–gas interfaces. Interscience Publishers, New York, 1965.
40. *Lundstrom I., Lundquist L.* A hydrogen sensitive MOS field-effect transistor. *Appl. Phys. Lett.*, **26**, 55–7 (1975).
41. *Lundstrom I.* Hydrogen sensitive MOS-structure. Part 1: Principles and applications. *Sensors and Actuators*, **1**, 403–26 (1981).
42. *Lundstrom I., Soderberg D.* Hydrogen sensitive MOS-structures. Part 2: Characterization. *Sensors and Actuators*, **2**, 105–38 (1981/1982).
43. *Lundstrom I., Shivaraman M.S., Svensson C.* Chemical reactions on palladium surfaces studied with Pd-MOS structures. *Surface Science*, **64**, 497–519 (1977).
44. *Poteat T.L., Lalevic B.* Transition metal-gate MOS gaseous detectors. *IEEE Trans. Electron Devices*, **ED-29**, 123–9 (1982).
45. *Krey D., Dobos K., Zimmer G.* An integrated CO-sensitive MOS transistor. *Sensors and Actuators*, **3**, 169–77 (1982/1983).
46. *Stenberg M., Dahlenback B.I.* Surface-accessible FET for gas sensing. *Sensors and Actuators*, **4**, 273–81 (1983).
47. *Blackburn G.F., Levy M.L., Janata J.* Field-effect transistor sensitive to dipolar molecules. *Appl. Phys. Lett.*, **43**, 700–1 (1983).

Биосенсоры на основе полупроводниковых газовых сенсоров

Бенгт Даниельссон, Фредрик Винквист

27.1. Введение

Эта глава посвящена применению в биологии полупроводниковых газовых сенсоров со структурой PdМОП, разработанных Лундстремом и другими [1]. К числу таких сенсоров в первую очередь относятся чувствительные к водороду полевые транзисторы со структурой металл-оксид-полупроводник (PdМОППТ), которые могут реагировать и на водородсодержащие соединения, например аммиак и сероводород. В нашей первой работе в этой области Даниельссон и другие [2] показали, что чувствительный к аммиаку PdМОППТ в принципе можно использовать как преобразователь в «ферментном транзисторе» с участием ферментов уреазы и креатининиминогидролазы. После этой предварительной работы мы предприняли более детальное изучение возможности применения водородселективных PdМОП-структур для контроля концентрации водорода в системах с образованием водорода, включая фермент гидрогеназу (ЕС 1.12.2.1) [3]. Открытие способов воспроизводимого улучшения чувствительности PdМОП-структур к аммиаку [4] возродило интерес к изучению сочетаний таких сенсоров с биологическими системами. Результаты недавних работ показали, что на основе чувствительных к аммиаку PdМОППТ можно создать высокоспецифичные и чувствительные биосенсоры [5–7].

В настоящее время одной из наиболее перспективных и быстро развивающихся областей является биотехнология, вызывающая огромный политический, экономический, научный и общечеловеческий интерес во всем мире. В этой связи получили признание и биосенсоры, поскольку они, с одной стороны, являются продуктом биотехнологии, а с другой – инструментами, позволяющими осуществлять измерения в биотехнологических процессах в сложных средах, культуральных бульонах и *in vivo*. Для таких измерений необходимы сенсоры, обладающие механической прочностью, стабильностью характеристик в процессе эксплуатации, нечувствительностью к засорению и мешающим веществам. Часто такие сенсоры должны иметь также высокую чувствительность и небольшие размеры. В этом отношении очень хорошо зарекомендовали себя наши биосенсоры, созданные на базе полупроводниковых газовых сенсоров, в которых детектор отделен от изучаемого раствора газопроницаемой мембраной, а непосредственно контактирует с пробой только биологический компонент биосенсора. Обычно мы применяем небольшие колонки, заполненные высокоустойчивым иммобилизованным биокатализатором. В большинстве случаев можно применять большой избыток катализатора, что обеспечивает постоянство рабочих параметров колонки независимо от изменения состава пробы, буферной емкости, рН, ионной силы, цвета, мутности, температуры, наличия денатурирующих агентов и в известной степени даже от концентрации ингибитора.

Этим ППТ выгодно отличаются от ИСПТ (ионоселективных полевых транзисторов), которые функционируют непосредственно в растворе пробы и отклик которых по этой причине зависит от рН, буферной емкости и концентрации других ионных соединений, близких по природе определяемому соединению.

В общем случае к положительным качествам полупроводников следует отнести небольшие затраты на их производство с помощью обычной технологии полу-

проводниковых материалов, связанные с этим небольшие размеры и возможность создания многофункциональных устройств, а также непосредственной интеграции с электронными устройствами для обработки сигналов. Эти качества особенно важны при использовании сенсоров *in vivo*; здесь они могут послужить основой для создания миниатюрных биосенсоров с несколькими ферментными катализаторами на одном кристалле, что позволит одновременно определять несколько веществ или одно вещество по нескольким каналам (для повышения надежности результатов). Так, Сиббальд и другие [8] описали ХЧПТ с четырьмя детекторами для одновременного определения калия, натрия, кальция и ионов водорода. Другим преимуществом полупроводниковых сенсоров является низкое общее сопротивление их соединений с электронными устройствами, что обеспечивает меньшую чувствительность выходного сигнала к электрическим помехам.

Применение газовых детекторов для контроля биохимических реакций, протекающих в растворе, интересно и с той точки зрения, что в газовой фазе определяемое вещество имеет относительно более высокую концентрацию, чем в растворе, так как детектор можно поместить в сравнительно небольшой объем газа. Действительно, чувствительность по отношению к NH_4^+ в водном растворе порядка 0,1 мкМ легко достигается с помощью газового сенсора с чувствительностью всего лишь около $10^{-4}\%$ NH_3 (газ). Аналогичные результаты получены и для других сенсоров.

Ниже будут описаны теория и основные проблемы изготовления полупроводниковых сенсоров, чувствительных к водороду и аммиаку, способы измерения с помощью таких сенсоров, а также конкретные примеры, включающие гидрогеназу как водород-образующую систему, системы с рециркуляцией, различные генерирующие аммиак системы, в том числе уреазу, креатинкиназу и деаминазу аминокислот.

27.2. Физические основы

Чувствительные к водороду устройства типа PdМОП изготавливают напылением непористой палладиевой пленки толщиной 100–200 нм на кристалл кремния *p*-типа с выращенным термически слоем диоксида кремния толщиной 100 нм (рис. 27.1). Сенсоры можно изготавливать как конденсаторы с алюминиевой пленкой в качестве неподвижного контакта или как полевые транзисторы (рис. 27.2). В последнем случае в тот же кристалл включают регулируемые обогревающие элементы (рис. 27.3). Конденсаторы, отличающиеся простотой изготовления и поэтому чаще всего применяющиеся в исследовательских работах (например, при изучении эффектов различных пленок), при работе помещают на металлическую пластину с регулируемой температурой. Размер конденсаторов равен приблизительно 1 мм².

Реакции, лежащие в основе чувствительности устройств на основе PdМОП к

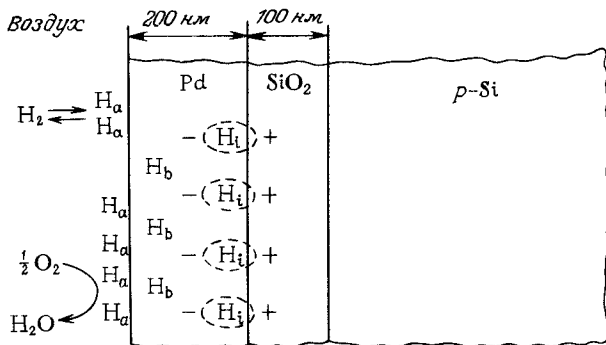
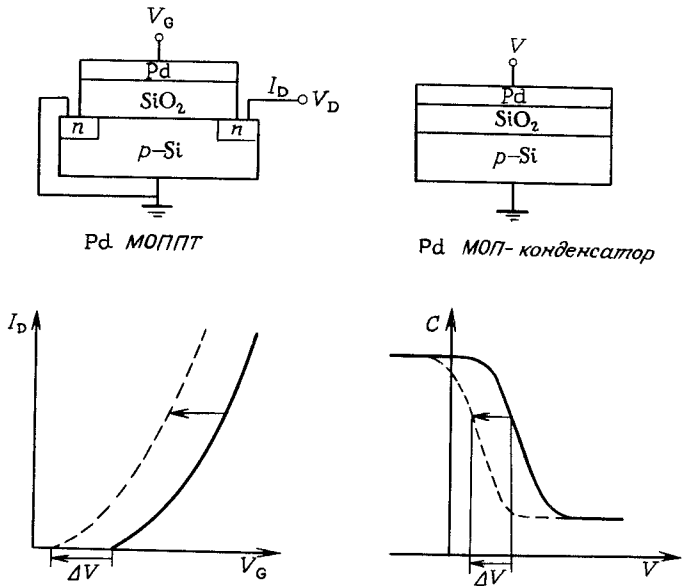


Рис. 27.1. Схематическое изображение химических реакций, происходящих на границе раздела с палладием.

Рис. 27.2. Слева: схема PdМОПТТ и его вольт-амперные характеристики. Справа: схема PdМОП-конденсатора и соответствующая кривая зависимости C от V . Как показано штрихпунктирными линиями, в результате взаимодействия систем с водородом кривые смещаются влево.



водороду, происходят на поверхности и внутри палладиевого слоя. Как показано на рис. 27.1, на палладиевой поверхности молекулы водорода диссоциируют на атомы; адсорбированные атомы водорода частично диффундируют в палладиевый слой, где под воздействием электрического поля они поляризуются. Таким образом получается дипольный слой, который вызывает падение напряженности электрического поля, в результате чего $I_D - V_G$ -характеристики транзистора или кривая зависимости C от V

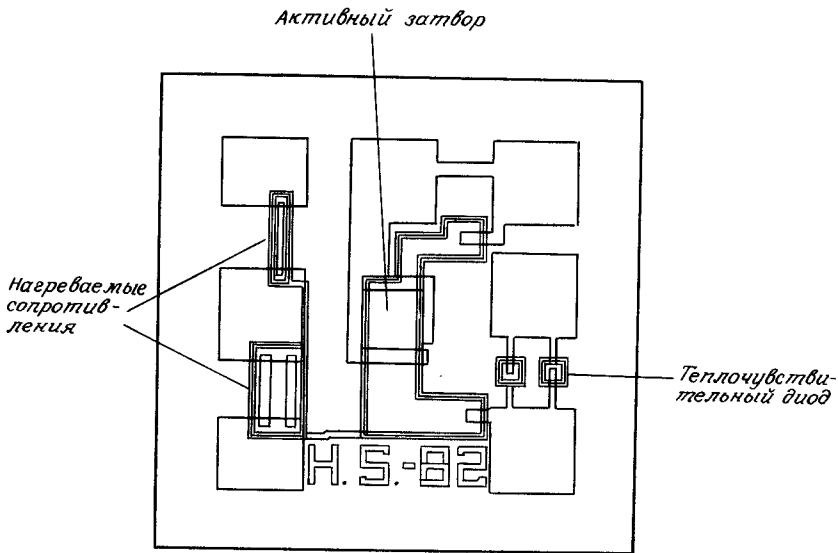


Рис. 27.3. Кристалл с микросхемой ($2,5 \times 2,5$ мм), содержащий PdМОПТТ с встроенным контролем температуры. Кристалл можно монтировать на корпусе типа TO-18.

конденсатора смещаются вдоль оси напряжения (см. рис. 27.2). Зависимость падения напряжения от парциального давления водорода описывается уравнением

$$\Delta V = C_1 (P_{H_2})^{0.5} \quad \text{при } P_{H_2} \leq 50 \quad (27.1)$$

Здесь C_1 — постоянная, зависящая от свойств палладиевого слоя, его толщины, величины активной площади и т. д. Обычно C_1 равна примерно $27 \cdot 10^4$ мВ/%. Атомы водорода выделяются из палладиевого слоя в результате рекомбинации до молекул водорода или соединения с кислородом (если последний присутствует в системе) с образованием воды. Следовательно, чувствительность сенсора в отсутствие кислорода (около $0,01 \cdot 10^{-4}\%$) должна быть значительно более высокой, чем в присутствии кислорода (около $1 \cdot 10^{-4}\%$). Наличие кислорода значительно сокращает и время восстановления, хотя его можно уменьшить и другим способом, поддерживая рабочую температуру сенсора на уровне $100-150^\circ\text{C}$ (обычная рабочая температура PdМОППТ). Такая температура способствует также тому, что молекулы воды не адсорбируются на поверхности сенсора. При низкой концентрации водорода время отклика сенсора равно примерно 1 мин. Устройства типа PdМОП детально описаны Лундстремом [9].

27.2.1. Повышение чувствительности сенсоров к газообразному аммиаку

Чувствительность обычных устройств типа PdМОП к аммиаку мала. Как показали Винквист и другие [4], чувствительность к NH_3 можно значительно повысить за счет второго субмонослоя подходящего металлического катализатора, например иридия или платины (рис. 27.4). Обычно в этих исследованиях применяли иридий, поскольку он обеспечивает высокую чувствительность к NH_3 и сравнительно малую — к H_2 . До настоящего времени изучали устройства типа конденсаторов с иридиевым слоем номинальной толщины 3 нм, напыленным с нити накала через металлический шаблон на палладиевую Т-образную пленку (см. вставку на рис. 27.4).

Теперь будут доступны и сенсоры NH_3 типа МОППТ с встроенным контролем температуры. В отличие от водородных сенсоров наши сенсоры NH_3 обычно работают

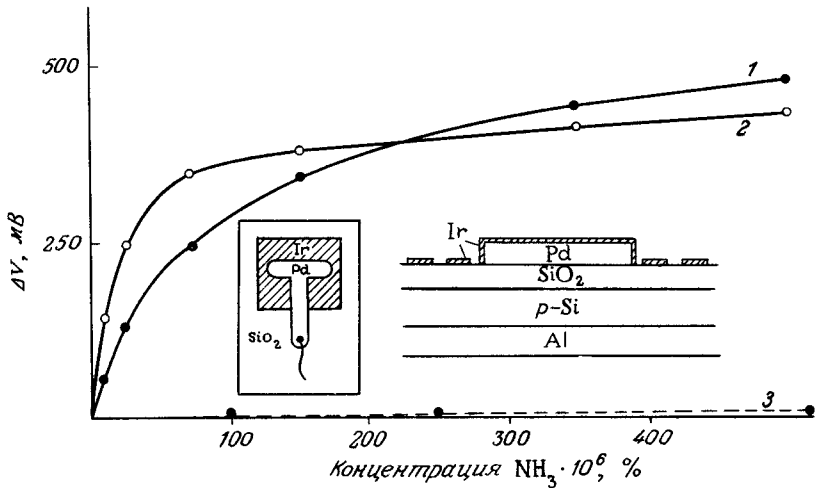


Рис. 27.4. Отклик в установившемся состоянии немодифицированного (3) и модифицированных Ir (1) и Pt (2) PdМОП. На вставке изображены схемы и поперечное сечение PdМОП-конденсатора, модифицированного тонкой пленкой иридия.

при комнатной или слегка повышенной температуре (35 °С; при этом предотвращается конденсация паров воды). Это значит, что биохимический элемент биосенсора можно разместить в непосредственной близости от детектирующего элемента. Достигнутая чувствительность составляет $1 \cdot 10^{-4}\%$ NH_3 . При низкой концентрации NH_3 ($\leq 5 \cdot 10^{-3}\%$) отклик сенсора описывается уравнением

$$\Delta V = C_2 (P_{\text{NH}_3})^a, \quad (27.2)$$

где C_2 и a – постоянные (обычно $C_2 = 24 \cdot 10^{-4}$ мВ/% и $a = 0,55$). Винквист и другие [6] показали, что если IгМОП контактирует с NH_3 только очень короткое время (Δt), то при низкой концентрации NH_3 ($\leq 5 \cdot 10^{-3}\%$) максимальное изменение напряжения сенсора равно

$$\Delta V = k P_{\text{NH}_3} \Delta t, \quad (27.3)$$

где k – постоянная. Аналогичное линейное уравнение описывает и поведение PdМОП, чувствительного к H_2 . Обычно $\Delta t \leq 60$ с, что достаточно велико для обеспечения надежности измерений при сохранении линейной зависимости.

27.3. Экспериментальные исследования

Если исследуемая проба представляет собой газ, то оформление эксперимента может быть довольно простым. Оказалось, что удобнее работать в импульсном режиме, сравнительно быстро вводя небольшие порции газа, поскольку между низкими концентрациями газа и выходным сигналом существует линейная зависимость (см. уравнение 27.3). Кроме того, в импульсном режиме меньше ощущается дрейф базовой линии. Пробу газа можно вводить с помощью регулируемого таймером миниатюрного соленоидного клапана, в нормальном состоянии открытого для воздуха, но пропускающего пробу в течение короткого промежутка времени, например 10 с. При непрерывном контроле таймер может автоматически повторять эту операцию, например каждые 10 мин. Пробу удобно подавать к сенсору через клапан с помощью перистальтического насоса со скоростью около 1 мл/мин. В силу относительно высокой чувствительности обычно возникает необходимость в разбавлении пробы, для чего на выходе из насоса поток пробы смешивают с потоком воздуха или азота; поток газа-разбавителя регулируется игольчатым вентилем или регулятором расхода, которые обеспечивают необходимую степень разбавления. Затем разбавленный газ проходит через небольшую проточную ячейку, в которой установлен сенсор. Газ-разбавитель, кроме того, хорошо промывает ячейку между измерениями.

В случае водных проб сначала необходимо перевести определяемое соединение в газовую фазу так, чтобы его концентрация в последней отражала начальную концентрацию в жидкой фазе. Эту задачу можно решить с помощью схематично изображенного на рис. 27.5 устройства, в котором жидкая фаза отделяется от газовой на пористой газопроницаемой тефлоновой мембране (такие мембраны выпускают в США под названиями Fluorogore или Millipore) с размером пор от 0,2 до 5 мкм. При обычной скорости потока (0,5–1 мл/мин пробы и 2,5 мл/мин воздуха или азота) достаточно мембраны площадью 1–3 см². Проходящий через мембрану газ со скоростью 1 мл/мин поступает в ячейку сенсора. Пробы вводят через инъекционный клапан с петлей объемом 0,5 мл. Для ввода нескольких потоков газа удобны многоканальные перистальтические насосы (например, Miniplus H8, Gilson, Франция). Насос можно использовать также для разбавления или смешивания. В случае высоких концентраций, требующих большего разбавления, можно сочетать это устройство с описанными выше приспособлениями.

При работе с чувствительными к NH_3 конденсаторами со структурой IгМОП

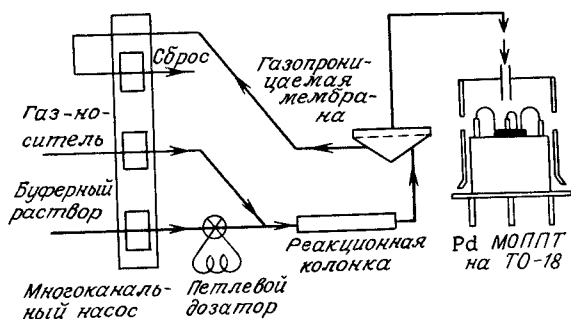


Рис. 27.5. Проточная система для определения водорода в растворах.

можно модифицировать операции, поскольку в конденсаторах сенсорная поверхность расположена очень близко от газопроницаемой мембраны. На таких коротких расстояниях удовлетворительный перенос газа осуществляется за счет одной лишь диффузии, поэтому необходимость в газе-носителе отпадает (рис. 27.6). Для подачи буферного раствора и пробы используется перистальтический насос. Скорость подачи за мембраной (пористый тефлон диаметром 4 мм, диаметр пор 5 мкм) равна 0,4 мл/мин; мембрана отстоит от сенсора на 0,2 мм. Для повышения давления над мембраной к выходу проточной ячейки подсоединяют трубку длиной 0,5 м и внутренними диаметром 0,2 мм. Пробы вводят через инжекционный клапан с петлей объемом 0,2 мл. При необходимости нетрудно повысить рН элюата ферментной колонки или раствора, содержащего ионы NH_4^+ , путем смешивания с щелочным раствором, повышающим долю свободного NH_3 . Впрочем, сенсор обеспечивает поразительно высокую чувствительность даже при довольно низком рН. На рис. 27.7 представлены отклики сенсора на растворы NH_3 при рН 7,7 и 12,7. Следует отметить, что продуцирующие аммиак ферментные системы обычно проявляют максимальную эффективность при довольно высоком рН (рН > 8).

Винквист и сотрудники разработали другой ферментный сенсор, напоминающий электрод [5]. В этом сенсоре слой фермента нанесен непосредственно на газопроницаемую мембрану, которая в свою очередь расположена вблизи конденсатора со структурой IgМОП (см. ниже).

Компания Sensistor АВ (Линчепинг, Швеция) выпускает сенсоры типа PdМОПТ и соответствующее оборудование для определения водорода; планируется вскоре начать выпуск IgМОПТ для определения NH_3 с помощью того же оборудования. Описанные здесь эксперименты по разработке чувствительных к NH_3 сенсоров проводились с фарадметром и регулятором температуры, изготовленными в лаборатории прикладной физики Линчепингского университета.

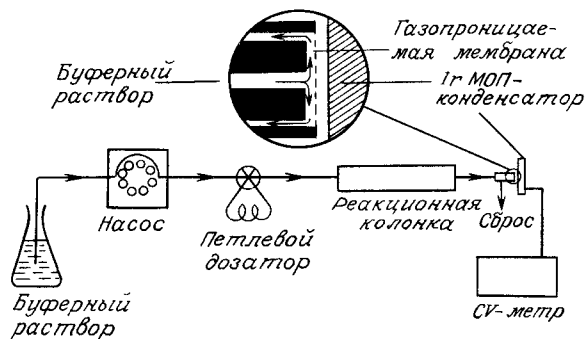
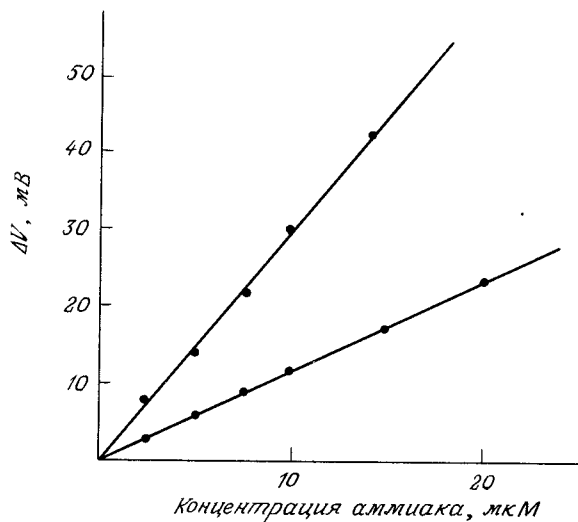


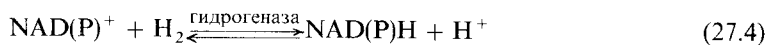
Рис. 27.6. Экспериментальная установка для проточно-инжекционного определения аммиака, включающая IgМОП-конденсатор.

Рис. 27.7. Градуировочные кривые для определения аммиака, полученные путем введения аликвот стандартного раствора аммиака (0,2 мл) в установку для проточно-инжекционного анализа при рН 7,7 и 12,7 соответственно.



27.3.1. Получение иммобилизованной гидрогеназы

Гидрогеназа (ЕС 1.12.1.2) является основным ферментом, применяемым в сенсорах типа PdМОППТ, чувствительных по отношению к водороду. Причину такой популярности гидрогеназы легко понять, если учесть, что она катализирует реакцию



Мы применяли гидрогеназу, выделенную из *Alcaligenes eutrophus* Н16 и иммобилизованную на пористом стекле с регулируемым размером пор по методике, описанной Винквистом и другими [10].

27.4. Результаты

27.4.1. Определение газообразного водорода

Выпускаемый компанией Sensistor Co. водородный газовый сенсор предназначался в первую очередь для обнаружения утечек водорода. Имея такой сенсор, можно с помощью недорогого и неядовитого водорода, например, обнаруживать повреждения в подземных электрических кабелях или линиях электросвязи. Для этой цели водород вводят в один конец кабеля и затем локализуют утечку, поскольку водород легко просачивается через почву.

Водород образуется или расходуется во многих важных процессах, а в анаэробных условиях продуцируется многими микроорганизмами. Кроме того, различные гидрогеназные системы привлекают большое внимание и как потенциально очень ценные источники энергии, поскольку эти системы участвуют в микробиологическом или фотосинтетическом образовании водорода. Мы показали, что схематично изображенное на рис. 27.5 устройство на основе PdМОППТ можно применять для контроля микробиологических процессов, в которых образуется водород [11]. В ходе этих работ мы изучали в первую очередь микроорганизмы *Clostridium acetobutylicum*, иммобилизованные в альгинатных гранулах, а образующиеся газы после разбавления анализировали с помощью изображенного на рис. 27.5 устройства.

Клиленд и другие [12] применили сенсор со структурой PdМОП для изучения выделения водорода в культуре *E. coli*. В ходе этих работ было, в частности, показано, что водород продуцируется только в анаэробных условиях. Действительно, его концентрация резко возрастала при снижении концентрации кислорода до нуля и быстро падала при введении кислорода, поскольку последний ингибирует гидрогеназную систему. Предлагалось применять сенсор со структурой PdМОП для обнаружения недостаточно эффективного перемешивания (застойных зон), например, при экспериментальном масштабировании биореакторов, так как любые локальные анаэробные зоны будут продуцировать водород, который легко обнаружить высокочувствительным водородным детектором.

Хернстен и другие [13] с помощью чувствительного к водороду PdМОППТ изучали влияние ампициллина на энтеробактерии. Для этого большое число проб энтеробактерий, взятых у пациентов с заболеваниями мочевых путей, культивировали в запаянных ампулах; количество образовавшегося водорода определяли, вводя 2 мл изучаемого газа в ячейку сенсора типа PdМОППТ. Молекулярный водород является конечным продуктом смешанного кислотного брожения энтеробактерий и, следовательно, степень ингибирования образования водорода является мерой чувствительности бактерий к ампициллину. Почти во всех пробах в течение 5 ч удалось выяснить, остались ли бактерии жизнеспособными в присутствии ампициллина. Полученные результаты хорошо согласуются с выводами, достигнутыми с помощью обычного метода диффузии в агаровом диске. Эти результаты свидетельствуют о том, что определение продуцируемого водорода может стать полезным, простым и быстрым методом оценки устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

Недавно Хернстен и другие с помощью сенсора для оценки продуцирования водорода [15] исследовали устойчивость к ампициллину штамма *E. coli*, вызывающего заражение мочевых путей [14]; параллельно определяли три других параметра системы, в том числе выделение тепла с помощью ферментного термистора [16] (см. также гл. 29), внутриклеточную концентрацию АТФ и образование кислот и оснований.

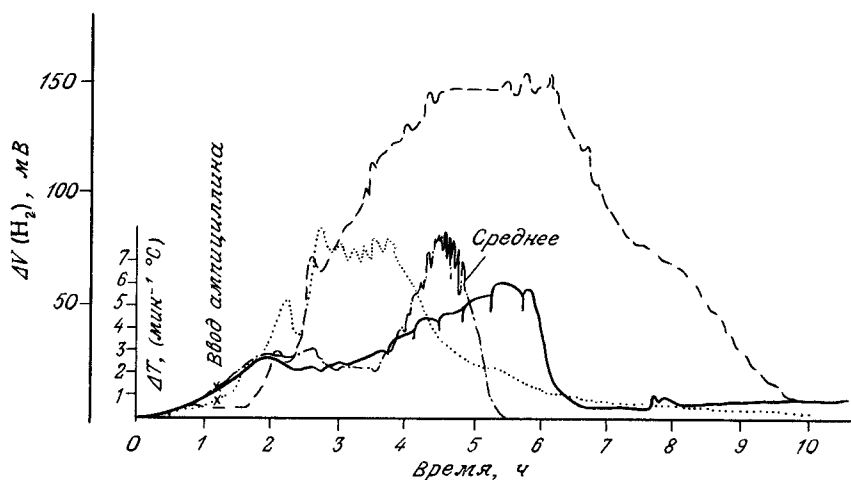
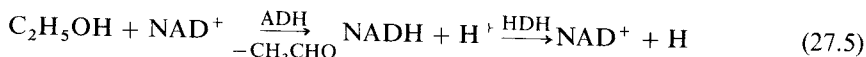


Рис. 27.8. Выделение водорода и тепла в анаэробной культуре *E. coli* в присутствии ампициллина в минимальной ингибирующей концентрации (4 мг/л) и в отсутствие ампициллина. Кривые (---) и (—) — термограммы в присутствии и в отсутствие ампициллина соответственно; кривые (.....) и (-----) — концентрация водорода в присутствии и в отсутствие ампициллина соответственно.

Выделение водорода, тепла, образование кислот и оснований определяли в реальном масштабе времени в суспензионных культурах *E. coli* (2–2,5 л) в различных средах в зависимости от количества добавленного ампициллина. Водород отбирали перистальтическим насосом через регулируемый таймером соленоидный клапан и разбавляли воздухом, как это описано выше (см. разд. 27.3). Оказалось, что все четыре определения дают ценную информацию. Очевидно, что даже два различных определения повышают надежность результатов. Легко осуществляемый с помощью сравнительно простых методик и устройств контроль продуцирования водорода в ходе культивирования даст четкую картину устойчивости культуры к антибиотику. На рис. 27.8 представлены результаты двух сравнительных экспериментов в отсутствие ампициллина и в присутствии этого антибиотика.

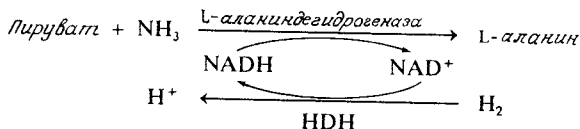
27.4.1.1. Гидрогеназа. Аналитическая система, схема которой изображена на рис. 27.5, может быть применена для определения NADH и NAD^+ , если ее дополнить небольшими реакционными колонками, содержащими около 1 мл гидрогеназы (HDH), иммобилизованной на пористом стекле с регулируемым размером пор. Раствор NADH (0,5 мл) вводили в поток буферного раствора Трис·HCl (pH 8,0) и выделяющийся в катализируемой HDH реакции водород определяли с помощью PdМОППТ. Градуировочная кривая линейна до концентрации NADH 0,5 мМ и в этом диапазоне описывается уравнением $c_{\text{NADH}}(\text{мкМ}) = 0,1\Delta V(\text{мВ})$; предел обнаружения NADH равен 0,03 мМ. Система позволяет анализировать по меньшей мере 10 проб в час [3].

Эту же систему можно применить для определения NAD^+ , воспользовавшись катализируемой HDH обратной реакцией, в которой расходуется H_2 . В этом случае к буферному раствору добавляли $100 \cdot 10^{-4}\%$ H_2 и 0,1 мМ NADH . Калибровочная кривая линейна в диапазоне 0,05–0,6 мМ. Далее с целью расширения сферы применения водородных сенсоров мы изучали сочетания различных дегидрогеназ и HDH. Например, этанол можно определять с помощью следующей последовательности реакций:



Здесь ADH – алкогольдегидрогеназа. Интересна методика непосредственного определения летучих субстратов дегидрогеназ в газовых пробах с помощью совместно иммобилизованных дегидрогеназы и HDH, находящихся во «влажной» колонке, насыщенной буферным раствором и коферментом. В этой методике пробу вводят в поток газа-носителя, который переносит образующийся в реакционной колонке водород к детектору типа PdМОП. В предварительных экспериментах с парами этанола и альдегида получены обнадеживающие результаты.

Поскольку иммобилизованная HDH сравнительно устойчива, а реакционная смесь не загрязняется никакими субстратами и продуктами, кроме H_2 и H^+ , представляется реальной и регенерация кофермента. Мы показали, что непрерывная регенерация NADH действительно осуществляется в системе, в которой иммобилизованные аламиндегидрогеназа и HDH превращают пируват в аланин [17]:



Можно надеяться, что подобная система регенерации кофермента будет использоваться в сочетании с сенсорами типа PdМОП для усиления сигнала последних аналогично тому, как Шеллеру и сотрудникам [18] удалось усилить сигнал фермент-

ного термистора с помощью субстратных амплифицирующих систем. Реализация такого усиления сигнала должна привести к созданию чрезвычайно высокочувствительных методик.

27.4.2. Аналитические системы на основе определения NH_3

Ион аммония является слабой кислотой с $\text{p}K_a = 9,25$; это означает, что ионы NH_4^+ находятся в равновесии с NH_3 в диапазоне pH от 6 до 12. При определении аммиака в водных растворах с помощью проточной аналитической системы на базе конденсатора IgМОП измеряют только концентрацию NH_3 . Следовательно, в ходе анализа необходимо тщательно контролировать pH раствора. При повышении pH повысится концентрация газообразного NH_3 и возрастет кажущаяся чувствительность системы. Чувствительность максимальна при $\text{pH} > 11$. При определении аммиака в неорганических пробах (например, в дождевой или речной воде) мы поддерживали pH 12,5. В случае биологических проб такая величина pH неприемлема, так как в сильно щелочных средах лабильные азотсодержащие соединения могут разрушаться с образованием аммиака; например, не допускается, чтобы pH проб крови превышал 8,5.

Общую концентрацию аммиака (суммарную концентрацию аммиака и ионов аммония) в водных растворах можно определить с помощью проточной системы, схематично изображенной на рис. 27.6, если исключить из этой системы реакционную колонку. На рис. 27.7 представлены линейные градуировочные графики, полученные с помощью проб объемом 0,2 мл при pH 7,7 и 12,7 соответственно. Линейный характер градуировочных графиков сохраняется до концентрации 50 мкМ, а предел обнаружения аммиака (при отношении сигнал/шум, равном 3) составляет 0,4 мкМ при pH 7,7 и 0,2 мкМ при pH 12,7. Высокая чувствительность позволяет определять общий аммиак в пробах крови и сыворотки объемом всего лишь 20 мкл даже после их десятикратного разбавления. Ожидаемый диапазон определяемых концентраций равен 10–70 мкМ. Небольшой объем пробы делает эту методику особенно удобной для использования в педиатрии. Следует подчеркнуть также, что методика в равной степени применима и для анализа проб цельной крови, поскольку ни окраска, ни мутность пробы не мешают определению.

В качестве иллюстрации рабочих характеристик сенсора на рис. 27.9 представлены результаты непрерывного и периодического определения общего аммиака в буферном растворе с pH 7,7. Концентрацию аммиака изменяли ступенчато каждые 4 мин.

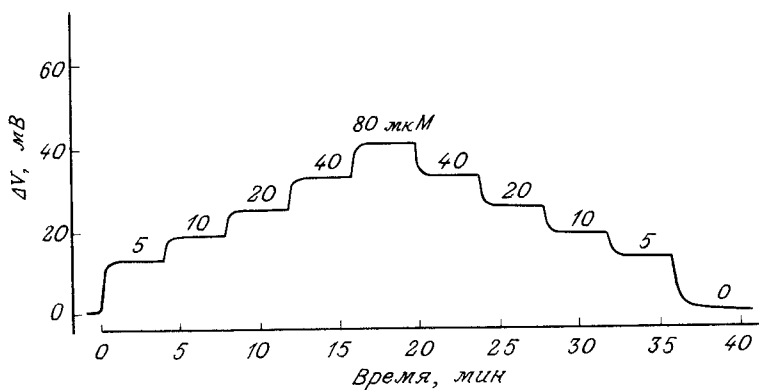


Рис. 27.9. Данные непрерывного мониторинга концентрации аммиака в буферном растворе (pH 7,7). Концентрацию аммиака изменяли ступенчато каждые 4 мин.

Недостатком имеющихся в настоящее время сенсоров типа IgМОП является тот факт, что определению NH_3 мешают некоторые низкомолекулярные амины и водород. В табл. 27.1 приведены результаты сравнительного изучения отклика сенсора на

Таблица 27.1. Отклик конденсатора со структурой IgМОП на различные амины (50 мкМ) при рН 7,7 в сравнении с откликом на аммиак (50 мкМ, общая концентрация)

Соединение	Относительная чувствительность, %
Общий аммиак	100
Метиламин	10
Этиламин	5
Бутиламин	0
Диэтиламин	2
Этаноламин	2
Этилендиамин	1

некоторые амины и аммиак. Оказалось, что в случае газообразных проб отклик на амины даже выше отклика на аммиак [6]. Отсюда следует, что устранение мешающих определению аммиака факторов должно включать операцию разделения фаз и совершенствование свойств мембраны. Возможно, что удастся модифицировать и каталитические свойства сенсорной поверхности. В альтернативных вариантах могут использоваться (ферментные) колонки-поглотители или дифференциальные измерения. Впрочем, в изученных до настоящего времени сферах применения мы не почувствовали, что наличие мешающих определению аммиака веществ будет серьезной проблемой.

27.4.2.1. Определение мочевины. Мочевину определяли с помощью проточной аналитической системы, изображенной на рис. 27.6, снабженной колонкой (40 × 2 мм) с Эупергитом С (полиакриловыми бусинами, выпускаемыми фирмой Röhm-Pharma GmbH, Дармштадт, ФРГ), на котором иммобилизовано 40 м.ед. уреазы. Из одной молекулы мочевины уреазы образует две молекулы аммиака:

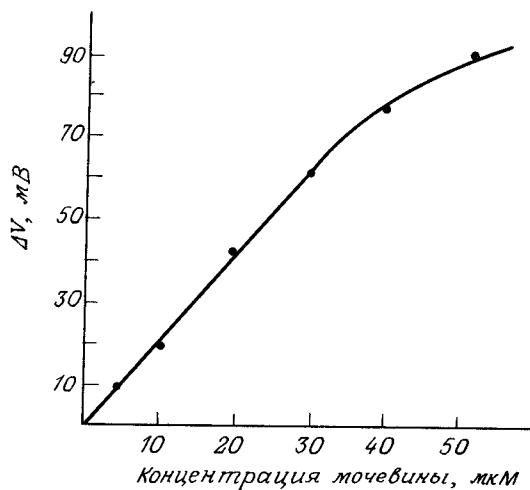
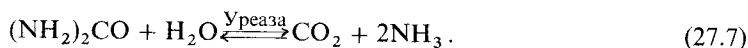
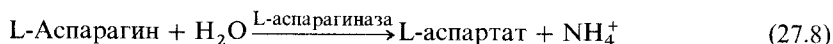


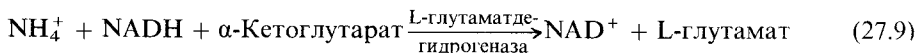
Рис. 27.10. Градуировочная кривая для определения мочевины с помощью реакционной колонки, содержащей 40 м.ед. уреазы. Кривая получена путем добавления аликвот (0,2 мл) стандартного раствора мочевины при рН 8,1.

Большое количество фермента обеспечивает полное превращение мочевины и постоянство характеристик колонки в течение по меньшей мере месяца ее эксплуатации, несмотря на неоптимальное значение pH буферного раствора [5]. Анализ выполняли в 0,05 М Трис·HCl (pH 8,1), тогда как уреазы проявляет максимальную активность при pH 7,0. Градуировочная кривая для проб объемом 0,2 мл линейна вплоть до концентрации 40 мкМ, а предел обнаружения равен 0,2 мкМ (рис. 27.10). В течение часа можно проанализировать 20 проб сыворотки, разбавленной в 500 раз, с погрешностью около 2%. Очевидно, скорость выполнения анализов недостаточна для обработки крупных серий проб и должна быть повышена, например за счет использования нескольких параллельных сенсоров (а возможно, и ферментных колонок) и соответствующего автоматического переключателя. Однако и имеющаяся в настоящее время проточная система великолепно обрабатывает ограниченное число проб, а в силу высокого постоянства характеристик и короткого стартового периода является вполне удовлетворительной дублирующей системой.

27.4.2.2. Определение L-аспарагина. Известны несколько ферментов, более или менее селективно дезаминирующих различные аминокислоты. Примером может служить L-аспарагиназа (ЕС 3.5.1.1):

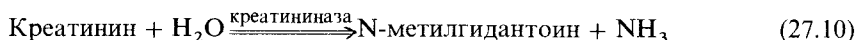


Если исследуемые пробы (например, пробы крови или сыворотки) обычно содержат аммиак, то последний можно связать на поглощающей колонке с L-глутаматдегидрогеназой и затем определять другие образующие аммиак соединения:



Примером применения поглощающих колонок может служить методика определения L-аспарагина в крови (сыворотке) [10]. Две последовательно соединенные тefлоновые колонки (32 × 2 мм), содержащие 20 ед. L-глутаматдегидрогеназы и 5 ед. L-аспарагиназы (иммобилизованных на Эупергите С) соответственно, подсоединяют к проточной системе, изображенной на рис. 27.6. В качестве буферного раствора применяют 0,05 М Трис·HCl (pH 8,2), содержащий 1 мМ NADH, 0,5 мМ α-кетоглутаровой кислоты и 3 мМ NaN₃. При комнатной температуре колонка с L-глутаматдегидрогеназой полностью связывает весь аммиак в пробах объемом 0,2 мл (0,5 мМ раствор аммиака) при скорости потока 0,4 мл/мин и тем самым обеспечивает удовлетворительный фон для разбавленных проб крови. Градуировочная кривая определения L-аспарагина линейна до его концентрации 40 мкМ; изменение напряжения составляет 0,8 мВ/мкМ. После анализа 20 проб колонки и трубки промывают в течение 5 мин 0,1 М раствором фосфата калия (pH 7,0), содержащим 0,8 М NaCl.

27.4.2.3. Определение креатинина. Недавно Винквистом и другими разработана методика определения креатинина в сыворотке и моче [19]. В этой методике с помощью конденсатора типа IgМОП определяют аммиак, образовавшийся при действии креатининиминогидролазы (креатининазы; ЕС 3.5.4.21), иммобилизованной на Эупергите С:



Колонке с креатининазой предшествует колонка с L-глутаматдегидрогеназой, связывающей эндогенные аммиак и ионы аммония. В качестве буферного раствора применяли 0,05 М Трис·HCl (pH 8,5). Методика определения креатинина не отличается от методики определения L-аспарагина. Если используется колонка объемом 0,1 мл,

содержащая 6 м.ед. креатининазы (выпускаемой фирмой Aalto Bio Reagents Ltd., Дублин, Ирландия), то при объеме проб 85 мкл линейная зависимость отклика от концентрации сохраняется до концентрации 30 мкМ, а предел обнаружения креатинина равен 0,2 мкМ. Весьма удовлетворительные результаты получены при сравнении рассматриваемой методики с применяющимися в настоящее время методами определения креатинина; так, в пробах сыворотки (разбавленной в 25 раз) и мочи (разбавленной в 1000 раз) содержание креатинина удалось определить с погрешностью около 3% без каких-либо серьезных помех со стороны других содержащихся в пробах веществ. Поскольку для анализа необходимо очень малое количество пробы, методика может оказаться особенно ценной в педиатрии, хотя относительно невысокая (15 проб в час) производительность системы затрудняет обработку большого количества проб.

27.5. Заключение

В проточной аналитической системе с ферментным реактором (рис. 27.6) изучали различные сочетания фермент-субстрат. Если активность реактора достаточна для полного превращения субстрата, то из данного количества субстрата образуется одно и то же количество аммиака независимо от сочетания фермент-субстрат. Об этом свидетельствуют приведенные в табл. 27.2 данные, полученные при изучении раз-

Таблица 27.2. Отклик конденсатора со структурой IgМОП на различные сочетания фермент-субстрат. Буферный раствор 0,05 М Трис·HCl, pH 8,5. Концентрация субстрата 10 мкМ в течение 30 с

Субстрат	Фермент	Продукты	Изменение напряжения, мВ
Мочевина	Уреаза	$\text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$	16
L-Аспарагин	Аспарагиназа	Аспарат + NH_3	8
L-Аспарат	Аспартаза	Фумарат + NH_3	8
L-Глутамат	Глутаматдегидрогеназа	α -Кетоглутарат + NADH + NH_3	8
Аденозин	Аденозиндеаминаза	Инозин + NH_3	8
Креатинин	Креатининиминогидро- лаза	N-Метилгидантоин + NH_3	8
NH_3		NH_3	8

личных сочетаний такого рода в идентичных условиях. В случае мочевины изменение напряжения в два раза выше, чем в случае других субстратов, так как из одной молекулы мочевины образуются две молекулы аммиака. В табл. 27.3 указаны рабочие диапазоны некоторых NH_3 -продуцирующих систем в условиях, описанных в предыдущем разделе.

Во введении мы обсудили преимущества и недостатки имеющихся сейчас конструкций сенсоров, предназначенных для изучения газовой фазы. Во многих конкретных ситуациях методику удалось бы значительно упростить, если бы зонд можно было поместить непосредственно в раствор пробы. Это особенно важно, если сенсор предназначен для контроля концентраций *in vivo*. В настоящее время в лаборатории Линчепингского университета ведутся работы по совершенствованию сенсоров со структурой PdМОП с тем, чтобы их можно было эксплуатировать в растворах электролитов. Предварительные результаты показывают, что такая цель может быть достигнута, однако пока еще не исследована возможность сочетания таких сенсоров с ферментами. В настоящее время основная проблема связана с медленным откликом

Таблица 27.3. Рабочие диапазоны при определении свободного NH_3 и NH_3 , образующегося в некоторых фермент-субстратных системах, с помощью проточно-инжекционной установки (рис. 27.6). Объем пробы 0,2 мл, скорость потока 0,4 мл/мин

Субстрат	Фермент	$\text{pH}_{\text{эксп}}$	Диапазон линейности, мкМ *
NH_3	—	7,7	0,4–50
NH_3	—	12,7	<0,2–50
L-Аспарагин	Аспарагиназа	8,2	0,2–40
Креатинин	Креатининиминогидро-лаза	8,5	0,2–30
Мочевина	Уреаза	8,1	0,2–40

* За нижнюю границу диапазона принят предел обнаружения (при отношении сигнал/шум, равном 3).

сенсора на изменение концентрации водорода. В частности, оказалось, что время отклика в растворах электролитов намного больше, чем в газах.

С другой стороны, в описанных в этой главе биосенсорах можно установить мембрану, на которой осуществляется разделение фаз, очень близко от сенсорной поверхности. Так, недавно мы изготовили сенсор, имеющий конструкцию зонда и сравнительно небольшие размеры, причем в случае необходимости размеры сенсора можно еще уменьшить [7]. На рис. 27.11 представлена принципиальная схема такого сенсора на базе конденсатора со структурой IrMOП и уреазы, а также его отклики на мочевину и аммиак. Сенсор заключен в трубку из полиэфирной смолы так, что с раствором контактирует только пористая тефлоновая мембрана с площадью поверхности 3 мм^2 . На мембране иммобилизована уреазы (200 м.ед.), сшитая поперечными связями глутаровым альдегидом. Этот биозонд отличается довольно вы-

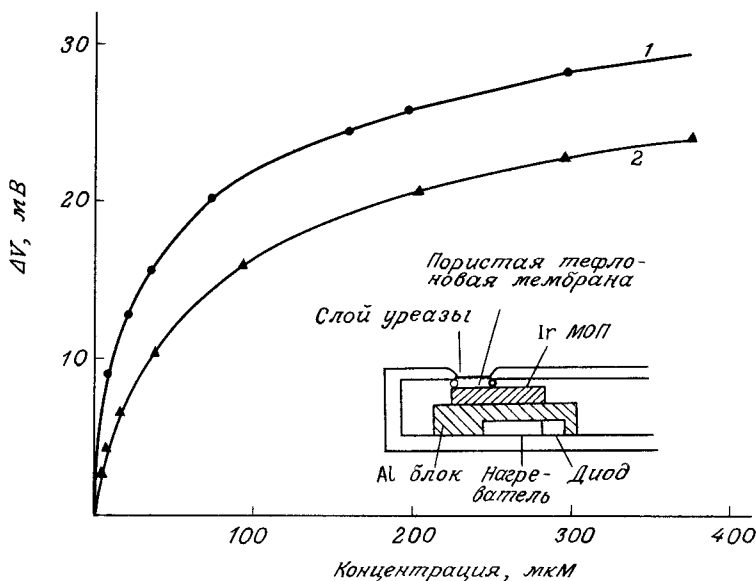


Рис. 27.11. Отклик уреазного сенсора в установившемся состоянии на мочевину (1) и NH_4^+ (2). На вставке схематично изображено поперечное сечение сенсора.

сокой чувствительностью, хотя его отклик медленнее, чем отклик проточных систем для определения аммиака. Чувствительность зонда по отношению к мочеvine выше, чем по отношению к аммиаку, так как из каждой молекулы мочеvины образуются две молекулы аммиака. Сочетание двух зондов, на одном из которых иммобилизована активная уреаза, а на другом инактивированный фермент, позволяет определять концентрацию мочеvины в пробах, содержащих эндогенный аммиак. В дальнейших исследованиях планируется уменьшить размеры зонда и разработать комбинированные системы с несколькими сенсорами, имеющие датчик сравнения или позволяющие определять одновременно несколько соединений.

Шивараман [20] убедительно показал, что сенсоры со структурой PdМОП чувствительны и к H_2S , причем порядок чувствительности к сероводороду, аммиаку и водороду примерно одинаков. Пока что не предпринималось попыток использовать это свойство сенсоров, хотя в принципе вполне возможны различные биологические применения в сочетании как с чистыми ферментами для обнаружения сернистых метаболитов, так и с микроорганизмами.

Нет сомнения, что дальнейшее развитие исследований в указанных здесь направлениях приведет к разработке таких полупроводниковых сенсоров, которые будут незаменимы при экспериментах и измерениях *in vivo*, а также к многокомпонентным сенсорам, «умным сенсорам» и, возможно, также к микробиозондам.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Lundström I., Shivaraman S., Svensson C.* A hydrogen sensitive Pd-gate MOS-transistor. *J. Appl. Phys.*, **46**, 3876–81 (1975).
2. *Danielsson B., Lundström I., Mosbach K., Stibler L.* On a new enzyme transducer combination: The enzyme transistor. *Anal. Lett.*, **12**, 1189–99 (1979).
3. *Danielsson B., Mosbach K., Lundström I.* Bioanalytical applications of hydrogen- and ammonia-sensitive palladium gate MOS devices. In Proc. int. meeting on chemical sensors in Fukuoka, Kodansha, Tokyo, pp. 507–12. Elsevier, New York, 1983.
4. *Winquist F., Armgarth M., Nylander C., Lundström I.* Modified palladium metal-oxide-semiconductor structures with increased ammonia gas sensitivity. *Appl. Phys. Lett.*, **43**, 839–41 (1983).
5. *Winquist F., Spetz A., Lundström I., Danielsson B.* Determination of urea with an ammonia gas-sensitive semiconductor device in combination with urease. *Anal. Chim. Acta*, **163**, 143–9 (1984).
6. *Winquist F.* Determination of ammonia in air and aqueous samples with a gas-sensitive semiconductor capacitor. *Anal. Chim. Acta*, **164**, 127–38 (1984).
7. *Winquist F., Lundström I., Danielsson B.* Biosensors based on ammonia sensitive metal-oxide-semiconductor structures. *Sensors and Actuators*, **8**, 91–100 (1985).
8. *Sibbald A., Whalley P.D., Covington A.K.* A miniature flow-through cell with a four-function ChemFET integrated circuit for simultaneous measurement of potassium, hydrogen, calcium and sodium ions. *Anal. Chim. Acta*, **159**, 47–62 (1984).
9. *Lundström I.* Hydrogen-sensitive MOS-structures. Part I: Principles and applications. *Sensors and Actuators*, **1**, 403–26 (1981).
10. *Winquist F.* The use of hydrogen and ammonia sensitive semiconductor structures in analytical biochemistry – “Enzyme transistors”. *Methods in Enzymol.*, в печати (1986).
11. *Winquist F., Danielsson B., Lundström I., Mosbach K.* Use of hydrogen-sensitive Pd-MOS materials in biochemical analysis. *App. Biochem. Biotechnol.*, **7**, 135–9 (1982).
12. *Cleland N., Hörnsten G., Elwing H., Enfors S.-O., Lundström I.* Measurement of hydrogen evolution by oxygen-limited *E. coli* by means of a hydrogen sensitive Pd-MOS sensor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 268–70 (1984).
13. *Hörnsten G., Elwing H., Kihlström E., Lundström I.* Determination of molecular hydrogen in investigations of the susceptibility of *Enterobacteriaceae* to ampicillin. *J. Antimicrob. Chemother.*, **15**, 695–700 (1985).
14. *Hörnsten G., Danielsson B., Nilsson L., Lundström I.* Physiological studies of *Escherichia coli* under ampicillin stress and anaerobic conditions. (Работа готовится к публикации, 1986.)
15. *Hörnsten G., Danielsson B., Elwing H., Lundström I.* Sensorized on line determination of molecular hydrogen in *Escherichia coli* fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **24**, 117–21 (1986).
16. *Danielsson B.* Enzyme thermistor devices. *Methods in Enzymol.*, в печати (1986).

17. *Danielsson B., Winquist F., Malpote J.-Y., Mosbach K.* Regeneration of NADH with immobilized systems of alanine dehydrogenase and hydrogen dehydrogenase. *Biotechnol. Lett.*, **4**, 673–8 (1982).
18. *Scheller F., Siegbahn N., Danielsson B., Mosbach K.* High-sensitivity enzyme thermistor determination of L-lactate by substrate recycling. *Anal. Chem.*, **57**, 1740–3 (1985).
19. *Winquist F., Lundström I., Danielsson B.* Determination of creatinine by an ammonia-sensitive semiconductor structure and immobilized enzymes. *Anal. Chem.*, **58**, 145–8 (1986).
20. *Shivaraman S.* Detection of hydrogen sulfide with palladium-gate MOS field-effect transistors. *J. Appl. Phys.*, **47**, 3592–3 (1976).

МЕХАНИЧЕСКИЙ И АКУСТИЧЕСКИЙ ИМПЕДАНС

Глава 28

Принципы и возможности пьезоэлектрических преобразователей и акустических методов

Дэвид Дж. Кларк, Барри С. Блейк-Колеман, Майкл Р. Кэлдер

28.1. Введение

Акустические методы становятся все более тонкими, что связано прежде всего с развитием звуковой техники и навигационного оборудования (например, эхолотов и звуковых локаторов для обнаружения кораблей). Этот процесс сопровождается значительным прогрессом в технологии пьезоэлектрических преобразователей, особенно вблизи верхней границы ультразвукового диапазона частот, и созданием полимерных пьезоэлектриков. Однако до недавнего времени в биологических исследованиях акустические методы применяли сравнительно мало. Можно отметить некоторые успехи в области акустической микроскопии, создания сенсоров для определения поверхностных масс, акустической резонансной денситометрии и акустического импеданса неомогенных систем. Принципы и применение этих методов и обсуждаются в данной главе.

28.2. Пьезоэлектрические преобразователи

Пьезоэлектрические преобразователи занимают центральное место в большинстве акустических методов. Пьезоэлектричество было открыто братьями Кюри в 1880 г. Это явление связано с генерацией электрических диполей в природных анизотропных кристаллах, подвергаемых механическому напряжению [26]. В таких материалах обнаруживается также обратный эффект, а именно изменение размеров под влиянием электрического поля. Некоторые пьезоэлектрики являются и пирозлектриками, поляризация в которых обуславливается поглощением тепла [12]. Все материалы, проявляющие способность к пьезоэлектричеству, анизотропны, т. е. их кристаллические структуры не имеют центров симметрии. Все такие кристаллы относятся к одной из 32 точечных групп симметрии (кристаллографических классов). Из этих 32 классов 20 проявляют пьезоэлектрические, в том числе десять – пирозлектрические свойства. Из распространенных в природе кристаллов лишь немногие (например, кварц, турмалин, сегнетова соль) являются пьезоэлектриками [12]. На практике чаще всего применяют искусственные керамические пьезоэлектрики [83]. Однако в последнее время все больше используют полимерные пьезоэлектрики [52]. Поскольку полимеры обычно не удается получить в виде монокристаллов нужного размера, в таких материалах пьезоэлектрические эффекты наблюдаются в состоянии, когда все молекулы ориентированы вдоль одной оси. Различным состояниям ориентации соответствуют четыре типа симметрии [34]. Некоторые анизотропные биологические структуры (например, ДНК, белки) также можно рассматривать как пьезо- и пирозлектрики [33, 34], что может оказаться важным в исследованиях, связанных с молекулярными биосенсорами.

28.2.1. Керамические материалы

Наличие направления поляризации у природных пьезоэлектрических кристаллов приводит к возникновению естественной поляризации еще до приложения какого-либо поля. На рис. 28.1, *а* схематически показана структура высокополяризных кристаллов кварца при различной механической нагрузке. Искусственные пьезоэлектрические керамические материалы обладают улучшенными пьезоэлектрическими свойствами и имеют поликристаллическую структуру (например, титанат бария и различные цирконат-титанаты свинца). В таких материалах направления поляризации отдельных кристаллических доменов ориентированы случайным образом, и в исходном состоянии пьезоэлектрические свойства не проявляются. Поляризация керамики в сильных электрических полях при повышенных температурах (выше точки Кюри) приводит к одинаковой ориентации отдельных доменов (рис. 28.1, *б*). Керамические материалы

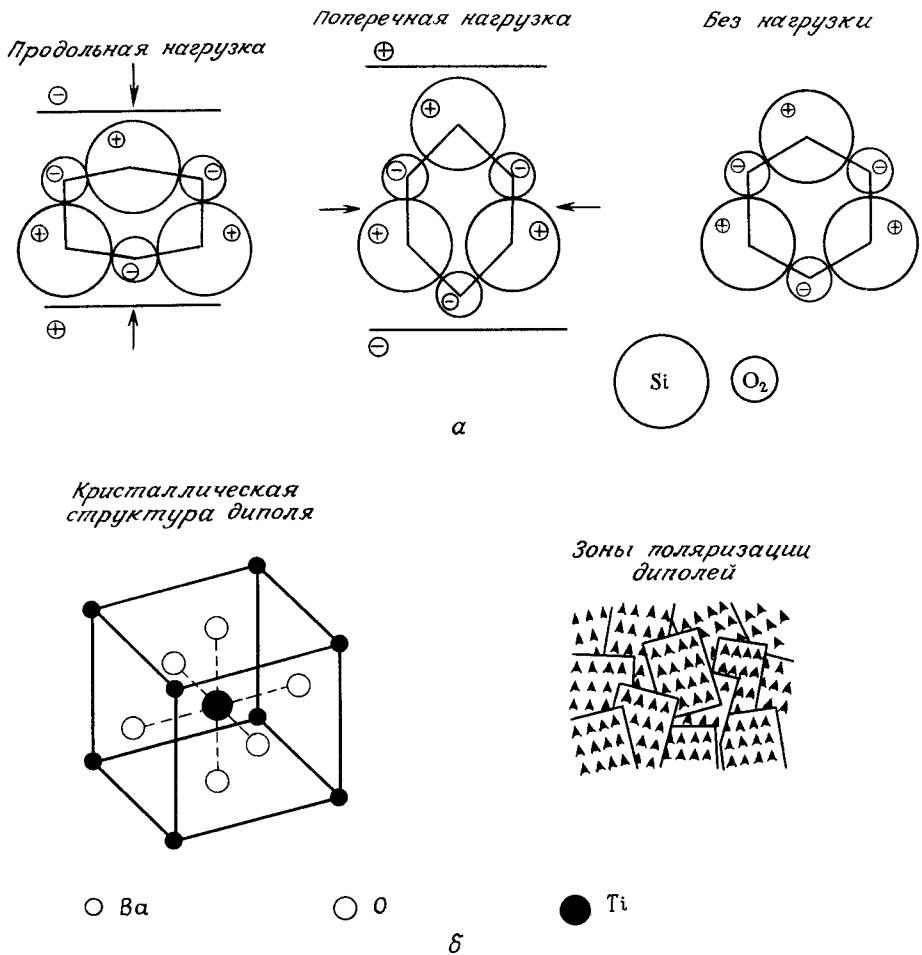


Рис. 28.1. Кристаллическая структура и структура доменов пьезоэлектрической керамики. *а*: кристаллическая структура кварца, показывающая изменение дипольного момента при не слишком большой нагрузке; *б*: структура барий-титанатной керамики.

обладают высокой химической устойчивостью и механической жесткостью. Путем спекания им можно придавать самые разнообразные формы и размеры [83].

28.2.2. Полимеры

Авторы [52] впервые установили, что высокая полярность элементарных звеньев в пластифицированном политрифторэтилене и жестком поливинилхлориде приводит к высокой пьезоэлектрической активности этих полимеров. Позже было найдено, что поливинилиденфторид (ПВДФ) способен поляризоваться в еще большей степени. ПВДФ представляет собой примерно равную смесь аморфного и кристаллического полимера. Последний в принципе может находиться в неполярной альфа- и высокополярной бета-форме, в которой атомы водорода и фтора расположены так,

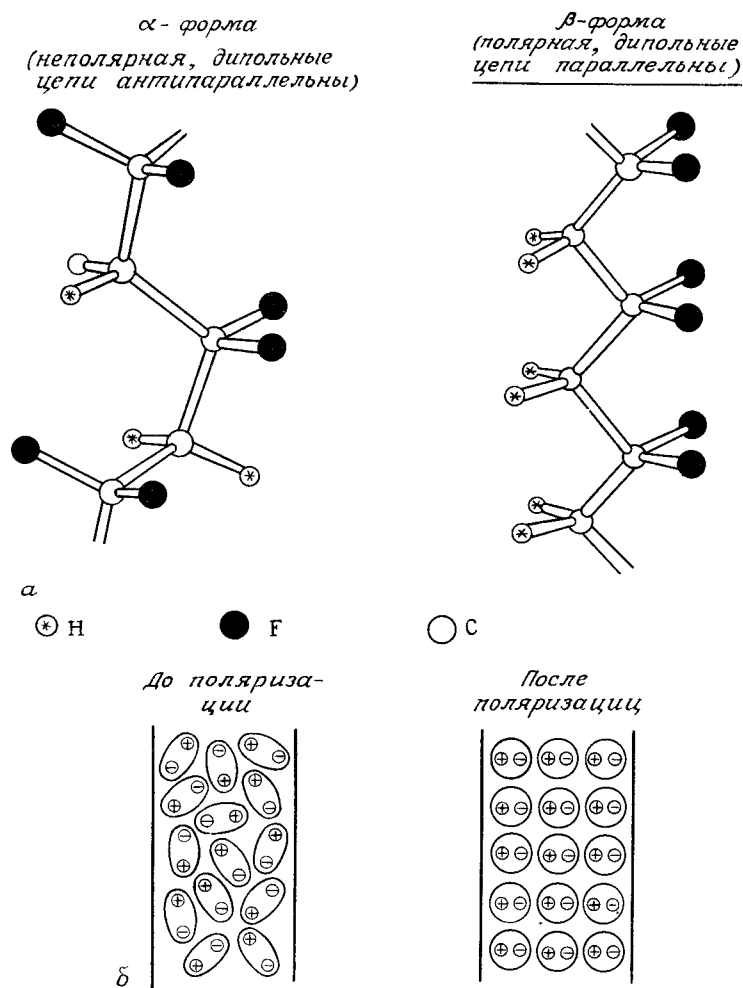


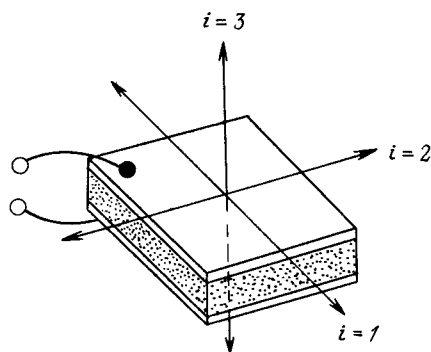
Рис. 28.2. Молекулярная структура и структура доменов пьезоэлектрической пленки из поливинилиденфторида. а: молекулярная структура поливинилиденфторида; б: ориентация диполей в поливинилиденфторидной пленке.

чтобы дипольный момент элементарного звена был максимален (рис. 28.2, а). До поляризации полимерные цепи ориентированы случайным образом (рис. 28.2, б). В промышленных процессах используют также растяжение пресованных или литых полимеров в направлении одной или двух осей, с тем чтобы заранее обеспечить преобладание бета-формы. В отличие от керамических материалов пленки из ПВДФ весьма податливы. Они не только устойчивы химически, но и являются более чувствительными преобразователями механической энергии в электрическую, чем керамические материалы и кристаллы кварца.

28.2.3. Режимы преобразования

В пьезоэлектрических материалах диполи в основном ориентированы по нормали к базовой кристаллографической плоскости. Пьезоэлектрики анизотропны, т.е. их электрические, механические и электромеханические свойства по-разному проявляются при электрическом или механическом преобразовании вдоль соответствующих осей. Для обозначения направлений векторов и тензоров принято использовать численные

	Полярность	Ось поля	Ось напряже- ния или де- формации	Свободная ось	Пьезоэлектри- ческие кон- станты
Длина	↓	↕	↔	↗↘	d_{31}
Ширина	↓	↕	↗↘	↔	d_{32}
Толщина	↓	↕	↕	↗↘	d_{33}



$$s_i = \frac{\Delta x_i}{x_i} = d_{3i} E$$

Рис. 28.3. Анизотропия механических, электрических и электромеханических параметров в типичных пьезоэлектрических материалах. Показана связь относительной деформации тела (s_i) в направлениях x_i при некоторой напряженности электрического поля E с константами d_{3i} , характеризующими пьезоэлектрическую деформацию (см. таблицу).

нижние индексы (рис. 28.3). Первый нижний индекс обозначает поляризацию и направление поля, а второй – механическое напряжение или ось деформации [34]. В общем случае поляризация направлена вдоль оси y (индекс 3), тогда как сила может прилагаться вдоль осей x (индекс 1), y или z (индекс 2). На рис. 28.3 приведены эти обозначения для пьезоконстанты (d). Аналогично описывают механическое напряжение или деформацию (g), относительную податливость (s), диэлектрическую постоянную (ϵ) и т.д. [34]. Таким образом, пластины преобразователя могут растягиваться в длину, ширину или толщину (рис. 28.3). Аналогично диски могут растягиваться вдоль радиуса (d_{31}) или в толщину (d_{33}), а кольца или трубки – в длину (d_{31}) или толщину (d_{33}). Пьезоэлектрические слои нередко наносят на не обладающие такими свойствами материалы для получения сдвиговых пластин (например, d_{13} для обеспечения напряжений в плоскости $x-z$). Для достижения изгиба слоистые (мультиформные) пьезоэлектрические материалы располагают последовательно или параллельно. Более того, при изготовлении пьезоэлектрических материалов можно изменять относительные значения их электрических, механических и электромеханических параметров в соответствии с требованиями для различных приложений. Следовательно, необходимо уделять особое внимание выбору соответствующего пьезоэлектрика для любой области приложения. Аналогично при установке пьезоэлектрических преобразователей в замкнутые зонды следует обращать внимание на конструкцию зонда (см., например, [55]). Структура и свойства базового материала и материалов, отделяющих преобразователь от исследуемой внешней среды, также существенно влияют на характеристики зонда [5, 6, 78, 82].

28.3. Биосенсорные устройства с пьезоэлектрическими преобразователями

Несмотря на широкий выбор пьезоэлектрических материалов, позволяющий варьировать принцип метода измерения, фактически все известные примеры использования пьезоэлектрических преобразователей в сенсорных устройствах сводятся к использованию осциллирующих кварцевых кристаллов со специальным покрытием для детектирования изменений поверхностных масс (гравиметрические сенсоры). Этот принцип широко применяют для газофазного анализа и определения летучих веществ [1, 35], но его приложение к измерениям в жидкой фазе остается проблематичным.

28.3.1. Принцип действия электрогравиметрических сенсоров

Для электрогравиметрических сенсоров используют, как правило, не природные, а выращенные в промышленных условиях кварцевые кристаллы, отличающиеся более высокой чистотой. Хотя резонансная частота пьезоэлектрика определяется в основном толщиной преобразователя, для подавления помех от гармоник и обертонов можно использовать специальные кварцевые кристаллы с Y -срезом, осциллирующие в сдвиговом режиме. Следует, однако, иметь в виду, что температурный коэффициент и резонансная частота зависят также от угла вращения [56]. Минимальные температурные коэффициенты имеют кристаллы со срезами АТ ($+35^\circ 15'$) и ВТ ($-49^\circ 00'$) [38, 56]. Хорошо изучены и другие рабочие характеристики [38]. В большинстве электрогравиметрических сенсоров используют кристаллы, срезанные с плоскости АТ, в виде тонких (10–15 мм) пластин или дисков, прилагая электрическое поле по оси y . Такие преобразователи осциллируют в режиме сдвига по толщине, параллельно основной оси, что приводит к антимодальному смещению поверхностей [1, 35, 38]. Кристаллы помещают в колебательный контур и с помощью обычной электронной техники измеряют их резонансную частоту (рис. 28.4). Частота колебаний в данной системе зависит от общей массы кристалла и его покрытия, как показано для АТ-кристалла [76,

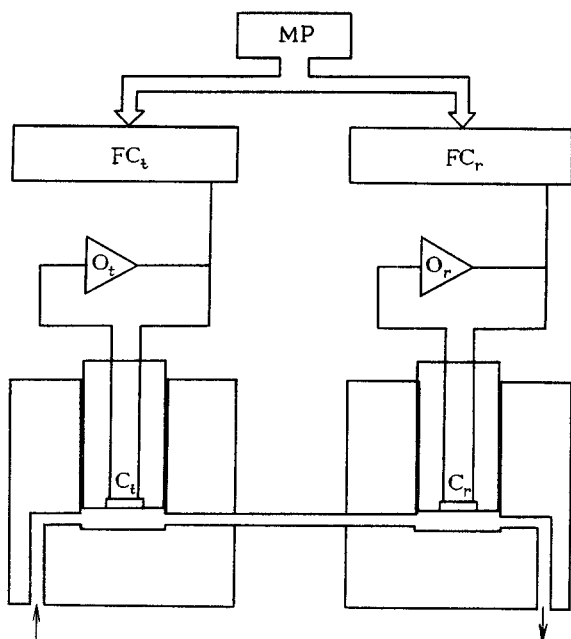


Рис. 28.4. Схема типичного электрогравиметрического сенсорного анализатора, включающего стандартный (C_t) и рабочий (C_r) кристаллические сенсоры, каждый из которых подключен к собственной колебательной цепи (O_r и O_t соответственно) с измерителями частоты (FC_r и FC_t соответственно), подсоединенными через интерфейс с общим микропроцессором (MP).

80]. Изменение резонансной частоты (Δf) вследствие адсорбции определяемого вещества можно рассчитать [76, 80] по формуле

$$\Delta f = -2,3 \cdot 10^6 f^2 \frac{\Delta m}{A},$$

где f – частота колебаний кристалла, Гц; m – масса адсорбированного вещества, г; A – площадь адсорбирующей или рабочей поверхности, см^2 . Оценки по этой формуле показывают, что на основе выпускаемых в промышленном масштабе кристаллов кварца можно создавать исключительно высокочувствительные (~ 500 – 2500 Гц/мкг) сенсоры с пределами обнаружения порядка нескольких пикограммов.

28.3.2. Гравиметрические биосенсоры

В работах [48, 49] пьезоэлектрические кристаллы впервые использовали в качестве детекторов в газовой хроматографии. Дальнейшее развитие и применение пьезоэлектрических кристаллов в аналитической химии описано в превосходных обзорах [1, 35, 36, 40]: на кристаллы наносили покрытие из соединений, селективно адсорбирующих определяемое вещество. Большая часть исследований в этой области связана с детектированием газов (диоксида серы, оксида углерода, хлористого водорода) или летучих веществ (ароматических и алифатических углеводородов) и тем самым не представляет интереса для биологии. Для нормальной работы гравиметрических сенсоров, как правило, требуется, чтобы относительная влажность была низкой и поддерживалась на постоянном уровне. Тем не менее сенсоры аммиака с различными химическими, биохимическими и полимерными покрытиями [30, 41, 45, 46], а также сенсоры растворенного диоксида углерода с кристаллами, покрытыми дидодециламином или диоктадециламином, вполне можно было бы использовать для контроля ферментационных процессов [20, 22], отделив сенсор от анализируемого раствора тефлоновой мембраной [77]. В работе [50] описан также метановый сенсор, который

хотя и эффективен, но, видимо, менее пригоден для мониторинга биопревращения отходов в метан по сравнению с другими углеводородными сенсорами [20, 22]. Во многих биологических процессах (например, в бродильных и пищевых производствах) большое значение имеют летучие, улавливаемые органолептически соединения, содержание которых обычно контролируют с помощью метода газовой хроматографии – масс-спектрометрии и других спектральных методов анализа. Можно предположить, что эти сложные методы могли бы быть вытеснены гравиметрическими сенсорами с достаточно селективными покрытиями. Аналогично анализу с применением ионоселективных электродов [21] предполагается, что для улучшения практической селективности кристаллических покрытий можно было бы проводить многокомпонентный анализ с коррекцией на различные помехи [1].

В 1972 г. Кинг [51] предложил использовать принцип адсорбции на поверхности пьезодатчика для анализа биологических жидкостей; тогда же Ричардсон [72] описал проблемы, возникающие при реализации этой идеи на практике. Позже [29] была предпринята попытка следить за скоростью роста микроорганизмов по их взаимодействию с кристаллами. Эта попытка оказалась безуспешной из-за низких скоростей роста и возможного разрушения клеток ультразвуком. В то же время авторы [39] с помощью чувствительной диафрагмы микрофона анализировали (с использованием техники преобразований Фурье) шум ресничных и жгутиковых микроорганизмов, движение которых весьма чувствительно к их энергетическому состоянию.

Наиболее серьезные затруднения в приложениях таких биосенсоров на практике связаны с вязким демпфированием колебаний, флуктуациями температуры среды и высокой вероятностью неспецифической адсорбции различных частиц. Применение пьезоэлектрических кристаллов в жидкостях активно исследовалось группой Номуры. Как и ожидалось, в растворах изменение частоты колебаний кристалла Δf существенно зависит от плотности ρ и вязкости η раствора. В работах [63, 65] получено следующее эмпирическое соотношение:

$$\Delta f = a\rho^{1/2} + b\eta^{1/3} - c,$$

где a , b и c – постоянные. Кроме того, резонансная частота уменьшается также с ростом концентрации электролита и удельной проводимости раствора, как и следовало ожидать, поскольку эти величины пропорциональны плотности раствора. Отмечены, однако, и некоторые необычные концентрационные эффекты [1, 61]. Так, линейная зависимость от удельной проводимости наблюдалась в растворах фосфатов металлов с концентрацией до приблизительно 2 мМ, когда возникали значительные отклонения от линейности, обуславливаемые вязкостью и плотностью. При концентрациях выше 20 мМ раствор накоротко замыкает кварцевый кристалл, что приводит к резкому изменению резонансной частоты. Многие соединения можно определять путем их электроосаждения на электродах. Например, иодид-ион определяли осаждением на золотом контакте кварцевого кристалла с покрытием Pt – Ag/AgCl [62]. Многие ионы металлов адсорбируются на поверхностях из растворов. Так, железо(III), свинец(II) и алюминий(III) можно определять, адсорбируя их фосфаты на тонкой стеклянной пластинке (чтобы предотвратить электроосаждение), которая непосредственно прилегает к поверхности кристалла (точнее, его контакта). В результате получается сенсор с приблизительно линейной характеристикой в диапазоне концентраций от 10 до 100 мкМ [61]. Те же принципы использовали при попытке разработать электрогравиметрический иммуносенсор [73]. В данном случае кристаллы с ST-срезами, генерирующие поверхностные акустические волны, помещали между никелевыми пластинами (как в плоских конденсаторах). Перед силанизацией и присоединением антител (IgG козла, иммунизированного антителами человека) участки между электродами протравливали. При погружении сенсора в буферные растворы обнаружено

значительное снижение резонансной частоты, зависящее от объема раствора в системе. Отклики модифицированных антителами и немодифицированных (эталонных) кристаллов на буферный раствор должны быть одними и теми же [53]. В действительности же они отличались, что было отнесено на счет различий в неспецифическом связывании, поскольку эталонный сенсор не имел белкового модификатора. Основной проблемой, однако, была недостаточная чувствительность сенсора – для создания на его основе клинически полезного прибора (например, гравиметрического иммуносенсора) пределы обнаружения следовало бы улучшить примерно на три порядка. Этого, видимо, можно было бы достичь, блокируя неспецифические центры адсорбции, увеличивая плотность заполнения поверхности иммобилизованными антителами, проводя иммобилизацию белка на эталонном кристалле и применяя более чувствительные кристаллы [73]. В некоторых случаях все это действительно приводит к заметному улучшению рабочих характеристик сенсоров (Baastians, неопубликованные данные). По мнению некоторых исследователей, пьезоэлектрические биосенсоры можно было бы улучшить и путем более тесного и целенаправленного сочетания принципов детектирования (не только самого детектора) и сенсорного лиганда (см., например, обзор Кларка и др. [23]). Кроме того, вполне можно было бы использовать пьезоэлектрические свойства природных биополимеров и их агрегатов (или структур), а не сосредотачивать внимание исключительно на поверхностном связывании.

Проблему демпфирования резонанса в кристалле в жидкой среде можно решить с помощью довольно простой процедуры, заключающейся в том, что адсорбцию проводят в растворе, а перед измерением на резонансной частоте сенсор высушивают на воздухе. Этот способ был продемонстрирован на примере кристаллов, которые погружали в хлороформ с экстрагированным хелатом 8-оксихинолината свинца [62]. Вместо того, чтобы полагаться на неспецифическую адсорбцию и/или удерживание экстрагированного свинца перед сушкой, следовало бы хелатирующий агент и другие лиганды иммобилизовать на поверхности кристалла, так же как и в сенсорах других типов [23].

28.4. Распространение акустических волн и акустический импеданс

Существуют довольно сложные теории прохождения акустических волн через маловязкие и вязкоупругие материалы. Можно ожидать, что использование этих теорий для получения какой-либо конкретной или биологически значимой информации из результатов акустических измерений будет затрудняться собственной сложностью и динамическим поведением растворов, суспензий или осадков биологических материалов. Многие из возникающих проблем, вероятно, разрешимы путем одновременного мониторинга многих параметров и многокомпонентного анализа. Несмотря на перспективность, в этой области известно сравнительно мало работ биологического направления, с чем, очевидно, и связано недостаточное внимание исследователей к этому предмету.

28.4.1. Основные принципы

Большинство методов акустического и ультразвукового анализа известно давно, хотя только сейчас стало возможным реализовать значительные преимущества современной техники обработки сигналов. В общем случае акустические волны вводят в среду, модифицирующую сигнал, и затем принимают этот сигнал либо тем же, либо специальным преобразователем. Иногда используют и другие методы регистрации (например, оптические).

В маловязких жидкостях сдвиговая жесткость предполагается пренебрежимо малой

по сравнению с жесткостью на сжатие, поэтому при низких частотах применимы реверберационные методы. Определяющими величинами здесь являются комплексный объемный модуль ($K = K' + jK''$) и мнимая компонента комплексного модуля сдвига ($G = G' + jG''$). Для вязкоупругих материалов необходимо принимать во внимание обе сдвиговые компоненты, что требует дополнительных измерений (например, измерения амплитуды продольных волн) и использования механики сдвига. В некоторых случаях параметры маловязкой жидкости можно измерить непосредственно. Чаще, однако, требуются многократные измерения (привязанные к определенной модели). Доминирующие механизмы потерь и термические эффекты приводят к тому, что затухание меняется с квадратом частоты, при этом в диапазоне частот ниже нескольких кГц потери столь малы, что для их определения требуется использовать резонансные частоты и/или большие объемы жидкости. Пьезоэлектрическая керамика пригодна для возбуждения только радиальных мод и для слежения за спадом сигнала после снятия возбуждения по достижении стационарного состояния [60]. Поскольку при высоких частотах высокие обертоны трудно идентифицировать, предпочтительна одновременная многомодовая частотная модуляция с последующей регистрацией картины затухания [57].

Давно известен такой метод измерения скоростей и затухания волн, как акустическая интерферометрия, обычно в конфигурации отражения волн при переменном расстоянии от единственного преобразователя [28]. В альтернативном варианте отражатель заменяют идентичным пьезоэлектриком, при этом принимаемый сигнал при изменении расстояния проходит через максимумы и минимумы [32]. Можно использовать и интерферометр с фиксированным расстоянием [16].

Возможно, один из наиболее полезных методов измерения затухания и скорости звука был предложен в работе [67]. Пьезометрический преобразователь излучает короткие дуги волн, выступая затем как приемник отраженного сигнала (метод «импульсного отражения»). Скорость определяют по характерному «времени переходного сигнала», а затухание волн — по зависимости интенсивности от расстояния до плоскости отражения. В таких методах существенна дифракция волн, особенно при низких частотах. Хотя скорости можно определять непосредственно по затуханию, здесь не менее полезны и методы фазового детектирования [59].

Для измерения скорости и затухания звуковых волн можно использовать также фотоакустический эффект [27]. Попеременное сжатие и разрежение, сопровождающие прохождение звуковой волны в жидкостях, фактически приводят к возникновению дифракционной решетки для света. По измеряемым дифракционным углам можно оценивать длины и, следовательно, скорости звуковых волн. Измеряя интенсивность дифракционного спектра, можно определить потери. Такие методы не следует путать с фотоакустической спектроскопией, в которой используется акустическая волна, сопровождающая генерацию термической волны путем поглощения модулированного света [13, 88]. Этот метод особенно пригоден для инфракрасной и видимой спектроскопии оптически плотных биологических препаратов [14, 15].

28.4.2. Приложения

Молекулярная акустика в общем играет относительно небольшую роль в исследовании гомогенных растворов биологических молекул. Измерение скоростей ультразвука может давать информацию о внутри- и межмолекулярных взаимодействиях макромолекул [43, 66, 81]. Ультразвуковая абсорбционная спектроскопия является средством изучения кинетики и термодинамики переноса протона, поскольку времена релаксации (< 100 пс) этих процессов лежат в пределах, достижимых при ультразвуковых частотах. Такие методы требуют прецизионного измерения скорости распро-

странения звука [31, 74], с тем чтобы можно было исследовать сжимаемость и гидратацию макромолекул [75]. Наличие ионизируемых групп принципиальным образом сказывается на спектрах поглощения аминокислот, что можно было бы использовать для определения соответствующих величин рК. Подобные эффекты отмечались для спектров поглощения растворов белков (метмиоглобина). Найдено также изменение скорости звука, обусловленное денатурацией белка [19, 44].

Акустический анализ негомогенных жидкостей (т.е. частиц, суспендированных в растворах электролитов, например, микробных культур) особенно сложен. С помощью ультразвука определяли концентрацию загрязнений в сточных водах [37]. Рост дрожжевых (и других) культур также контролировали ультразвуковым методом, используя гибкий пьезоэлектрический мембранный преобразователь, состоящий из полиацеталевой смолы, хлорированного полиэтилена и цирконат-титаната свинца [42]. Измерительная ячейка состояла из двух пьезоэлектрических мембран (каждая площадью $2,5 \times 1,5$ см и толщиной 0,2 мм), разделенных слоем культуральной жидкости толщиной 2,5 мм. Частоту колебаний передающей мембраны фиксировали равной 40 кГц так, чтобы на приемной мембране генерировался сигнал с амплитудой приблизительно 20–100 мВ. Хотя с ростом концентрации выходное напряжение должно увеличиваться [81], на самом деле в диапазоне концентраций от 10 до 500 мМ наблюдалось лишь небольшое увеличение амплитуды (приблизительно на 5 мВ). Рост скорости звука с температурой в диапазоне от 25 до 40°C также был незначительным. В процессе роста культур плотность культуральной среды нередко меняется, поэтому контролировали отклик сенсора при различных концентрациях глицерина (плотности от 1 до 1,10). Изменения амплитуды и в этом случае были малы. Напротив, введение популяций бактерий или дрожжей приводило к значительно бóльшим значениям сигнала (при изменении числа клеток от 1 до 10 в 1 мл амплитуда сигнала менялась от 20 до ~50–80 мВ). Отклик сенсора линейно зависел от числа клеток (до 10 клеток/мл) и лучше отражал кривую роста, чем данные измерений проводимости культур [11]. Хотя датчик мог выдержать несколько циклов паровой стерилизации, возможность растрескивания пьезомембраны создает серьезные проблемы. Принципы, лежащие в основе метода, не совсем ясны. Более или менее уверенно можно полагать только, что сжимаемость суспензии играет большую роль, чем скорость звука и плотность [42].

Значительный прогресс в понимании того, как распространяются ультразвуковые волны в негомогенных суспензиях (небиологических частиц), достигнутый в последние годы, связан главным образом с работами Чиверса и Ансона [2, 3, 17, 18]. В табл. 28.1 выделены основные параметры, представляющие интерес для моделирования акустического взаимодействия среды и суспендированных частиц в негомогенных системах. Хотя, как и можно было ожидать, при этом получают сложные математические выражения, особенно когда рассматривается динамика микробных культур и не-

Таблица 28.1. Некоторые параметры, которые измеряют при многокомпонентном анализе влияния различных факторов на распространение акустических волн в неоднородных суспензиях частиц в растворах электролитов

Измеряемый параметр	Характеристика гомогенной среды	Характеристика суспензии
Затухание	Плотность	Плотность
Специфическое поглощение (резонансное)	Поглощение продольных волн	Поглощение продольных волн
Задержка распространения	Вязкость	Ослабление поверхностного сдвига
Форма волн (фурье-анализ)	Объемный модуль	Упругость
Рассеяние и когерентность	Термическое расширение	Термическое расширение
Направление рассеяния	Теплоемкость	Теплоемкость

избежно содержащихся в них газовых пузырьков, измерения многих из этих величин могут быть полезны для многокомпонентного анализа (табл. 28.1). Это потребует распространения указанных моделей на биологические суспензии и, несмотря на их сложность, может дать биологически значимые результаты.

Ультразвуковые поля используют также для поляризации и агрегации клеточных популяций. Важным объектом приложения подобных эффектов являются способы электроакустического слияния клеток [24, 25]. Когда клеточные суспензии экспонируются в ультразвуковых полях, возникают две силы, способствующие сближению клеток. Первая сила, возникающая в стоячей волне, заставляет клетки двигаться ближе к максимумам скорости звукового поля. Вторая — направлена на то, чтобы клетки пришли в контакт, двигаясь перпендикулярно направлению амплитуды скорости в отсутствие клеток. Комбинация этих эффектов будет перемещать клетки преимущественно в те области звукового поля, где агрегационные силы максимальны [84].

28.5. Акустическая микроскопия

Хотя акустическую микроскопию нельзя рассматривать как биосенсорный метод, все же имеет смысл обсудить ее последние достижения, открывающие новые воз-

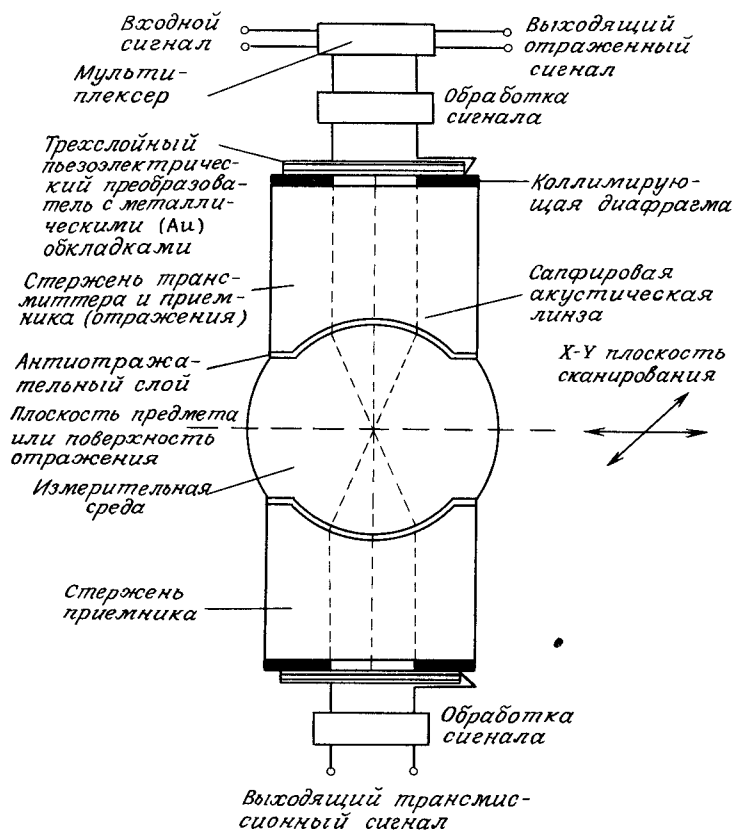


Рис. 28.5. Схема сканирующего акустического микроскопа, работающего как в режиме пропускания, так и в режиме отражения звуковых волн (подробности см. в тексте).

возможности для биологов. Эти возможности обусловлены не только высоким разрешением акустической микроскопии, сравнимым с разрешением оптической микроскопии, но и тем, что проникновение акустических волн через твердое вещество успешно используется для получения структурной информации на различных глубинах (см. обзоры [4, 86, 87]). Кроме того, обширные исследования, предпринятые в последнее десятилетие, значительно углубили понимание в ряде смежных областей.

Метод сканирующей акустической микроскопии, впервые продемонстрированный авторами [58, 69], основан на обнаруженном Соколовым в 1949 г. [79] факте, что акустические волны с частотой в диапазоне нескольких гигагерц в воде имеют длины волн, близкие к длинам волн видимого света.

Рис. 28.5 схематически иллюстрирует принцип работы акустического микроскопа одновременно как в трансмиссионном, так и в отражательном режимах. В первом случае используют два идентичных пьезоэлектрических преобразователя (ниобат лития при частоте ниже 150 МГц и оксид цинка при более высоких частотах) с сапфировыми линзами, тогда как во втором случае применяют конфигурацию с одним линзовым преобразователем, попеременно переключаемым в режимы возбуждения и приема. Возбуждающими радиочастотными (РЧ) сигналами воздействуют на пропускающие линзы, которые генерируют в сапфировом стержне продольные волны. Последние фокусируются оконечными линзами в пучок с сужением, ограничиваемым дифракцией. В трансмиссионном микроскопе приемная линза, конфокальная передающей, собирает и коллимирует акустический сигнал перед превращением его в электрический. Разрешение такого микроскопа в основном определяется сужением пучка. При использовании высококачественной широкоапертурной линзы ($f/0,7$) диаметр пучка может достигать $0,7\lambda$. Ясно, что теоретическое разрешение акустической микроскопии можно было бы увеличить еще больше с помощью методов обработки данных. Экспериментально показано [85], что при использовании итерационного алгоритма экстраполяции спектра, основанного на методе Герхберга, достижимо разрешение изображений выше критерия Релея.

Многие способы создания изображений, разработанные в оптической микроскопии (а именно создание стереоизображений, темнопольный, фазовый и дифференциальный фазовый контраст), имеют точные аналогии в акустической микроскопии [86]. При возбуждении РЧ-сигналом пьезоэлектрические преобразователи генерируют когерентные волны, которые в режиме приема снова превращаются в когерентный РЧ-сигнал. Следовательно, в каждой исследуемой точке развертки можно измерить как фазу, так и амплитуду. Для получения стереоизображения берут два изображения при различных углах плоскости сканирования; при формировании темного поля излучатель заменяют плоскостолбовым преобразователем, а перед приемной линзой помещают апертурную диафрагму нулевого порядка. Принципы фотоакустической спектроскопии используют также в акустических микроскопах. При этом в каждой исследуемой точке возможны количественные измерения.

Биологические материалы отличаются высокой акустической контрастностью без использования каких-либо методов окрашивания. С помощью сканирующей акустической микроскопии исследовали живые красные кровяные клетки и фибробласты цыпленка [86]. Этот хорошо разработанный метод, очевидно, можно успешно применять и во многих не менее интересных приложениях.

28.6. Акустическая резонансная денситометрия (АРД)

Идея определения массы по демпфированию колеблющегося резонатора принадлежит Релею [70, 71]. Хотя вибрирующие вискозиметры были описаны в 30-х гг. (см., например, [68]), лишь в конце 60-х гг. зависимость демпфирования механического

резонатора от массы стали использовать для регистрации измерений массы, причем с высокой чувствительностью [54].

В приборах для АД измерительная ячейка представляет собой трубчатую (см. рис. 28.6) или сферическую камеру фиксированного объема. Она изготавливается из упругого, но достаточно прочного материала с низким температурным коэффициентом (например, из кварца, нержавеющей стали или никелевого сплава), чтобы свести к минимуму термическое расширение и напряжения. Механический резонанс в камере возбуждается и поддерживается с помощью двух соленоидов. Соленоиды связаны в замкнутый колебательный контур, включающий усилитель переменного тока с фиксированным усилением. Усилитель обеспечивает резонансное смещение камеры с образцом в пределах его линейного диапазона, предотвращая негармонические колебания (радиальные и продольные) и оставляя почти исключительно поперечные смещения, требуемые для нормального функционирования трубчатой ячейки (рис. 28.6). В таких условиях существует прямая связь между плотностью образца и квадратом частоты колебаний, что исключает такие параметры, как вязкость образца. Наиболее простой подход заключается в термостатировании измерительной камеры и преобразования частоты (период τ) в плотность (ρ) при помощи двух калибровочных постоянных A и B :

$$\rho = \frac{1}{A}(\tau^2 - B).$$

В противном случае в формулы необходимо вводить соответствующие температурные поправки.

Удивительно, что точность (4–6 знаков) измерений плотности, обеспечиваемая этими приборами, долго не находила сколько-нибудь заметного применения в биологии. Недавно, однако, показано [7–10], что АД-приборы могут функционировать как линейные измерители биомассы микробов в исключительно широком интервале плотностей культур (рис. 28.6). Следовательно, их можно применять как для контроля выросших культур, так и для мониторинга их роста [10]. Преобразователь достаточно

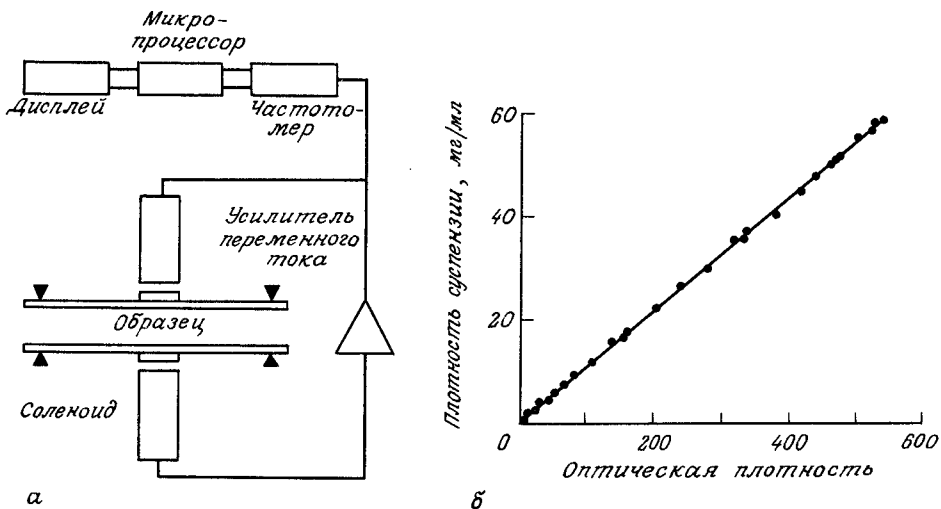


Рис. 28.6. Непрерывный контроль биомассы микробов методом акустической резонансной денситометрии (АД). а: схема АД-денситометра; б: корреляция между плотностью микробной суспензии, определяемой методом АД, и обычными измерениями оптической плотности (подробности см. в тексте).

прочен и не повреждается при паровой стерилизации. Собственный резонанс измерительной камеры, по-видимому, ослабляет микробные загрязнения; можно также вести периодическую очистку, звуковую или в токе пара.

Поскольку у большинства микроорганизмов плотность выше, чем у среды, в которой они суспендированы, увеличение числа микроорганизмов приводит к линейному росту плотности. Культуры, подвергаемые различным процедурам разрушения клеток, сохраняют ту же плотность [10]. Это свидетельствует о том, что акустический резонансный денситометр измеряет истинное изменение массы на единицу объема жидкости, а не более тонкие перемещения масс внутри клеточной структуры. Сама по себе плотность среды также меняется в ходе роста некоторых культур. В таких случаях, следовательно, необходимо одновременно контролировать и изменения плотности среды, с тем чтобы вычитать их из измеряемых изменений плотности всей культуры [9, 10]. Чтобы предотвратить заражение исследуемой культуры, для таких измерений можно использовать систему с двумя измерительными камерами, одна из которых снабжена проточным фильтром. Однако надежные устройства, обеспечивающие точный учет динамических изменений плотности среды, пока только разрабатываются [7, 8, 20].

28.7. Заключение и перспективы методов

Хотя акустические методы и не применяют столь широко, как другие биосенсорные методы, в настоящее время разрабатывается ряд новых принципов и методик, которые могут упростить биологические измерения. Следует отметить, что акустические свойства биологических материалов изучены недостаточно и в дальнейшем для этого придется применять более сложные методы измерения, моделирования и обработки данных. Значительное внимание уделяется разработке химических пьезоэлектрических сенсоров. Наряду с этим можно ожидать и создания ряда пьезоэлектрических биосенсоров, обладающих биохимической специфичностью. Как и в случае биосенсоров, основанных на других принципах, особое внимание необходимо уделять улучшению способов сопряжения биочувствительного материала и детектора.

ЛИТЕРАТУРА

1. Alder J. F., McCallum J. F. Piezo-electric crystals for mass and chemical measurements. *The Analyst*, **108** (1291), 1169-89 (1983).
2. Anson L. W., Chivers R. C. Frequency dependence of the acoustic radiation force function (Y_p) for spherical targets of a wide range of materials. *J. Acoust. Soc. Am.*, **69**, 1618-22 (1981).
3. Anson L. W. The use of absorbing polymeric materials for suspended sphere ultrasonic radiometry. *Acoust. Letts.*, **4**(4), 74-80 (1981).
4. Attal J. La microscopie acoustique. *La Recherche*, **14**, (Mai), 664-7 (1983).
5. Bainton K. F., Silk M. G. Some factors which affect the performance of ultrasonic transducers. *Brit. J. of N. D. T.*, **22**, 15-21 (1980).
6. Bainton K. F., Hillier M. J., Silk M. G. An easily constructed broad bandwidth ultrasonic probe for research purposes. *J. Phys. E (Sci. Instrum.)*, **14**, 1313-9 (1981).
7. Blake-Coleman B. C. Coil geometry and ARD apparatus. *Brit. Pat. Appl. No. 84085/27*, 1984.
8. Blake-Coleman B. C. Determination of biomass using ARD. *Brit. Pat. Appl. No. 84085/28*, 1984.
9. Blake-Coleman B. C., Calder M. R., Carr R. J. G., Moody S. C., Clarke D. J. Direct monitoring of reactor biomass in fermentation control. *Trends in Anal. Chem.*, **3**(9), 229-32 (1984).
10. Blake-Coleman B. C., Clarke D. J., Calder M. R., Moody S. C. Determination of reactor biomass by acoustic resonance densitometry. *Biotechnol. & Bioeng.*, **28**(8), 1241-7 (1986).
11. Cady P. Progress in impedance measurements in microbiology. In *Mechanizing microbiology* (eds. A. N. Sharpe, D. S. Clark, A. Balows), p. 199, John Wiley, New York, 1978.
12. Cady W. G. Piezo-electricity. McGraw Hill, New York and London, 1946.
13. Cahen D. G., Garty M., Becker S. Photoacoustic calorimetry of concentrated fluorescent solutions. *J. Phys. Chem.*, **84**, 3384-9 (1980).
14. Carpenter R., Larue B., Leblanc R. M. Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans* I. *Arch. Biochem. & Biophys.*, **222**(2), 403-10 (1983).

15. Carpenter R. Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans* II. Arch. Biochem. & Biophys., **222**(2), 411–5 (1983).
16. Carstensen E. L. Measurement of dispersion velocity of sound in liquids. J. Acoust. Soc. Am. **26**, 858–91 (1954).
17. Chivers R. C. Acoustic wave fluctuations in inhomogeneous media. J. Phys., **D 13**, 1947–51 (1980).
18. Chivers R. C., Anson L.W. Choice of target and accuracy of measurement in suspended sphere ultrasonic radiometry. J. Acoust. Soc. Am., **72**, 1670–95 (1982).
19. Cho K., Leung W.P., Mok H. Y., Choy C. L. Ultrasonic absorption in myoglobin and other globular proteins. Biochem. Biophys. Acta, **830**, 36–44 (1985).
20. Clarke D. J., Blake-Coleman B. C. Improvements in filters. Brit. Pat. Appl. No. 8514899, 1985.
21. Clarke D. J., Kell D. B., Burns A., Morris J. G. The role of ion-selective electrodes in fermentation control. I. S. E. Reviews, **4**, 75–133 (1982).
22. Clarke D. J., Blake-Coleman B. C., Calder M. R., Carr R. J. G., Moody S. C. Sensors for bioreactor monitoring and control—a perspective. J. Biotechnol., **1**, 135–58 (1984).
23. Clarke D. J., Calder M. R., Carr R. J. G. et al. The development and application of biosensor devices for bioreactor monitoring and control. Biosensors, **1**(3), 213–320 (1985).
24. Coakley W. T. Interfacial instability and cell membranes. APSM Bulletin, **5**, 16–18 (1985).
25. Coakley W. T., Hewison L. A., Tilley D. Interfacial instability and the agglutination of erythrocytes by polymers. Studia Biophysica. in press (1986).
26. Curie J., Curie P. Development, par pression, de l'électricité polarisée dans les cristaux hémédries et faces inclinées. Comp. Rend., **91**, 294–7 (1880).
27. Debye P., Sears F. W. Scattering of light by sound. Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.), **18**, 410–15 (1932).
28. Del Grosso V. A., Smura J. A., Fougere P. F. Ultrasonic investigations in liquids. Naval Res. Lab. Reports, NRL-4439 (1954).
29. Downes J. Monitoring of microbial growth using piezoelectric crystals. Internal Report, Imperial College, London, UK, 1979.
30. Edmonds T. E., Fraser S. M., West T. S. Polyvinylpyrrolidone coated piezoelectric quartz crystals as an ammonia sensor. Poster at Roy. Soc. of Chem. Int. Conf. on "Detection and Measurement of Hazardous Substances in the Atmosphere", City Univ., London, 20–22 December 1982.
31. Eggers F., Funck Th. Ultrasonic measurements with millilitre liquid samples in the 0.5 to 100 MHz range. Rev. Sci. Instrum., **44**(8), 969–73 (1973).
32. Fry W. J. The double crystal acoustic interferometer. J. Acoust. Soc. Am. **21**, 17–21 (1949).
33. Fukada E. Piezoelectricity in polymers and biological materials. Ultrasonics, Oct. 1968, 229 (1968).
34. Fukada E. Piezoelectric properties of biological macromolecules. Adv. in Biophys., **6**, 121–55 (1974).
35. Guilbault G. G. Use of piezoelectric crystal detector in analytical chemistry. I. S. E. Reviews, **2**(1), 4–15 (1980).
36. Guilbault G. G. Piezoelectric crystal detectors in analytical chemistry. Anal. Proc., **19**, 68–79 (1982).
37. Hayakawa N., Kori A. Ultrasonic probe for monitoring the concentration of wastewater sludge. Mizu Shori Gijutsu, **13**, 57–63 (1972).
38. Heising R. A. Quartz crystals for electrical circuits, p. 24. Van Nostrand, New York, 1946.
39. Hill R. J. The frequency dependent emission of low frequency sound by motile cultures of the ciliate *Tetrahymena thermophila*. Biochem. Biophys. Res. Commun., **117**(1), 190–5 (1983).
40. Hlavay J., Guilbault G. G. Application of the piezoelectric crystal detector in analytical chemistry. Anal. Chem., **49**, 890–2 (1977).
41. Hlavay J. Applications of piezoelectric crystal detectors in analytical chemistry. Anal. Chem., **50**, 1044–8 (1978).
42. Ishimori Y., Karube I., Suzuki S. Determination of microbial populations with piezoelectric membranes. Applied & Environ. Microbiol., **42**(4), 632–7 (1981).
43. Jacobson B. On the adiabatic compressibility of aqueous solutions. Ark. Kemi., **2**, 177–81 (1950).
44. Jurgens K. D., Baumann R. Ultrasonic absorption studies of protein–buffer interactions. Eur. J. Biophys., **12**, 217–22 (1985).
45. Karmarkar K. H., Guilbault G. G. The determination of ammonia and nitrogen dioxide at the parts per billion level with coated piezoelectric crystal detectors. Anal. Chim. Acta, **75**, 111–5 (1975).
46. Karmarkar K. H., Webber L. M., Guilbault G. G. Measurement of sulfur dioxide in automobile exhausts and industrial stack gases with a coated piezoelectric crystal detector. Anal. Chim. Acta, **81**(2), 265–71 (1976).
47. Kawai H. The piezoelectricity of poly (vinylidene fluoride). Jap. J. Appl. Phys., **8**, 975–9 (1969).
48. King W. H., Jr. Piezoelectric sorption detector. Anal. Chem., **36**, 1735–9 (1964).
49. King W. H., Jr. Piezoelectric sorption detector. U.S. Patent 3, 164, 004 (Jan. 5), 1965.
50. King W. H., Jr. Monitoring of hydrogen, methane and hydrocarbons in the atmosphere. Environ. Sci. & Technol., **4**(12), 1136–40 (1970).
51. King W. H., Jr. Chemical analysis using piezoelectric crystal detectors. Bull. N. Y. Acad. Sci., **48**, 459–69 (1972).

52. Кочарян Н. М., Пачаджян Б., Тиврикян Ж. «Наведенный» пьезоэлектрический эффект в некоторых полимерах. Докл. АН АрмССР, 1967. Т. 44(3). С.111-6.
53. Konash P. L., Baastians G. J. Piezoelectric crystal detectors in liquid chromatography. Anal. Chem., **52**, 1929-32 (1980).
54. Kratky O., Leopold H. Acoustic resonance densitometry. Austrian Patent No. 2704, 1968.
55. Krimholtz R., Loedom D., Matthaei G. New equivalent circuits of elementary piezoelectric transducers. Electron Letts., **6**, 398-402 (1970).
56. Lack F. R. et al: Angle of rotation of quartz crystals. Bell Syst. Tech. J., **13**, 453-6 (1934).
57. Lawley L. E., Reed R. D. C. A reverberation method for the measurement of the adsorption of ultrasonics in liquids. Acoustica, **5**, 316-9 (1955).
58. Lemons R. A., Quate C. F. Integrated circuits as viewed with an acoustic microscope. Appl. Phys. Letts., **24**, 163-6 (1974).
59. McSkimin H. J. Performance of high frequency barium titanate transducers for generating ultrasonic waves in liquids. J. Acoust. Soc. Am., **32**, 1401-5 (1960).
60. Mulders L. E. Ultrasonic reverberation measurements in liquids. Appl. Sci. Res., **B1**, 149-52 (1948).
61. Nomura T., Maruyama M. Effect of metal ions on a piezoelectric quartz crystal in aqueous solution and the adsorptive determination of iron III as its phosphate. Anal. Chim. Acta, **147**, 365-9 (1983).
62. Nomura T., Mimatsu T. Electrolytic determination of traces of iodide in solution with a piezoelectric quartz crystal. Anal. Chim. Acta, **143**, 237-41 (1982).
63. Nomura T., Okuhara M. Frequency shifts of piezoelectric quartz crystals immersed in organic liquids. Anal. Chim. Acta, **142**, 281-5 (1982).
64. Nomura T., Yamashita T., West T. S. Determination of lead by adsorption of the extracted 8-quinolino-late on the electrodes of a piezoelectric quartz crystal. Anal. Chim. Acta, **143**, 247 (1982).
65. Nomura T., Okuhara M., Murata K., Hattori O. Behaviour of a piezoelectric quartz crystal in organic solvents. Bunseki Kagaku, **30**(6), 417-21 (1981).
66. Passynski A. Compressibility of electrolytes. Acta Physiochem U. R. S. S., **8**, 385-9 (1938).
67. Pellam J. R., Galt J. K. Ultrasonic propagation in liquids. I Application of pulse techniques to velocity and absorption measurements at 15 megacycles. J. Chem. Phys., **14**, 608-12 (1946).
68. Philipoff W. Dynamische untersuchungen an kolloiden systemen. Physik Zeitschr., **35**, 884-905 (1934).
69. Quate C. F., Atlas A., Wickramasinghe H. K. Acoustic microscopy with mechanical scanning. Proc. I. E. E., **67**, 1092-6 (1979).
70. Rayleigh, Baron (alias Strutt J. W.). On the theory of resonance. Philos. Trans., **161**, 77-9 (1870).
71. Rayleigh, Baron. Vibrations of a liquid in a cylindrical vessel. Nature, **12**, 251 (1875).
72. Richardson P. D. The operation of piezoelectric crystal detectors in fluids. Bull. N. Y. Acad. Med., **48**, 465-9 (1972).
73. Roederer J. E., Baastians G. J. Microgravimetric immunoassay with piezoelectric crystals. Anal. Chem., **55**, 2333-6 (1983).
74. Сарвазян А. П., Харакоз Д. П. Молекулярная и клеточная биофизика. М.: Наука, 1977.
75. Sarvazayan A. P., Hemmes P. Ultrasonic investigation of the pH dependence solute-solvent interactions in aqueous solutions of amino acids and proteins. J. Phys. Chem., **83**(13), 1796-9 (1979).
76. Sauerbrey G. H. Use of a quartz vibrator for weighing thin layers on a microbalance. Z. Physik., **155**, 206-10 (1959).
77. Schuman M. S., Fogelman W. W. Nature of analysis for inorganics in water. J. Water Pollut. Control Fed., **49**(6), 901-5 (1976).
78. Silk M. G. The effect of constructional variations on ultrasonic probe performance. U.K. Atomic Energy Res. Est. Repts. AERE-R9, pp. 761-5, 1980.
79. Соколов С. Акустический микроскоп. Докл. АН СССР. 1949. Т. 64. С. 333-6.
80. Stockbridge C. D. Hydrostatic pressure on quartz crystal resonators. Vac. Microbalance Tech. **5**, 193-7 (1966).
81. Stuehr J., Yeager E. Physical acoustics (ed. W. P. Mason), Vol. 2, 1965, Part A, pp. 211-49.
82. Tamura M., Yamaguchi T., Oyaba T., Yoshimi T. Electroacoustic transducers with piezoelectric high polymer films. J. Audio. Eng. Soc., **23**, 21-5 (1975).
83. Van Randerat J., Setterington R. E. Piezoelectric ceramics. Mullard Ltd., 1974.
84. Vienken J., Zimmermann U., Zenner H. P., Coakley W. T., Gould R. K. Electro-acoustic fusion of erythrocytes and of myeloma cells. Biochem. Biophys. Acta, **820**, 259-64 (1985).
85. Walker J. G. Optical imaging with resolution exceeding the Rayleigh criterion. Optica Acta, **30**(4), 1197-202 (1983).
86. Wickramasinghe H. K. Acoustic microscopy: present and future. I. E. E. Proc., **131**, Part A, No. 4, 282-91 (1984).
87. Wiczowski J. Son et lumiere. Lab Practice, October 1984, 15-20 (1984).
88. Yip B. C., Yeung E. S. Photoacoustic spectroscopy in gases based on wavelength modulation. Anal. Chem., **55**, 978-87 (1983).

КАЛОРИМЕТРИЯ

Глава 29

Теория и практика калориметрических сенсоров

Бенгт Даниельссон, Клаус Мосбах

29.1. Введение

В последние годы опыт, накопленный в области иммобилизации ферментов, привел к разработке биоаналитических приборов, в которых «чувствующие» ферменты находятся в непосредственной близости от измеряющего элемента (преобразователя). Наиболее известным примером такой комбинации фермента с преобразователем является ферментный электрод. Описаны и другие комбинации, в том числе ферментный термистор и разного рода термические биоанализаторы. Общим принципом измерения в этих приборах является определение теплоты реакции. Ферментативные реакции сопровождаются значительным выделением тепла, обычно в диапазоне 25–100 кДж/моль (табл. 29.1). Таким образом, ферментная калориметрия имеет чрезвычайно широкие возможности. Недостаток специфичности калориметрии как аналитического метода полностью компенсируется специфичностью иммобилизованных биокатализаторов, каковыми являются ферменты. Использование биокатализаторов в сочетании с тепловыми преобразователями обладает и другими преимуществами — высокой чувствительностью, малым временем отклика, возможностью непрерывного управления потоком и, возможно, стабилизацией самих биокатализаторов.

Хотя различные варианты калориметрии иногда используют в биохимическом анализе [5, 19, 23], в рутинном биоанализе она все же не находит широкого применения, что можно объяснить высокой стоимостью и сложностью приборов и длительностью эксперимента. Ряд исследовательских групп пытались разработать простые и менее дорогостоящие калориметры для рутинной работы с иммобилизованными ферментами. Одним из первых был предложен «калориметр с малым объемом»,

Таблица 29.1. Мольные энтальпии реакций, катализируемых ферментами

Фермент	Субстрат	— ΔH , кДж/моль	Литература
Каталаза	Пероксид водорода	100	[36]
Холестериноксидаза	Холестерин	53	[36]
Глюкозооксидаза	Глюкоза	80	[41]
Гексокиназа	Глюкоза	28 (75) *	[29]
Лактатдегидрогеназа	Na-пируват	62	[4]
NADH-дегидрогеназа	NADH	225	[35]
Пенициллиназа	Пенициллин G	67 (115) *	[17]
Трипсин	Бензоил-L-аргининамид	29	[4]
Уреаза	Мочевина (фосфатный буферный раствор, pH 7,5)	61	[16]
Уриказы	Урат	49	[36]

* В скобках приведены значения ΔH , учитывающие протонирование Трис-буферного раствора (–47,5 кДж/моль [36]).

в котором фермент иммобилизовали на тонкой алюминиевой фольге, помещенной на поверхность элемента Пельтье, играющего роль температурного датчика [34]. Каплю исследуемого раствора наносили на слой фермента; при этом количество субстрата определяли по очень малому изменению температуры. Чувствительность метода, однако, невелика, невозможно проводить определение в потоке.

Наиболее простой подход использовали в термических ферментных датчиках [5, 30, 43], в которых фермент иммобилизовали непосредственно на термодатчике (термисторе) либо путем сшивания, либо удерживая фермент в диализном мешке, надетом на термистор. К сожалению, большая часть тепла, выделявшегося при ферментативной реакции, рассеивалась в окружающем растворе и не улавливалась термистором. По этой причине чувствительность была низкой, и даже если этот недостаток был до некоторой степени преодолен в более поздних конструкциях [37, 42], термические ферментные датчики предназначались главным образом для серийных анализов.

Существенно большая эффективность определения теплоты реакции достигнута в системах, в которых использовали небольшие колонки с ферментом, иммобилизованным на частицах носителя. К таким системам относятся «ферментный термистор» [30, 32] и проточный энтальпиметрический анализатор с иммобилизованным ферментом [3]. Описана также комбинация серийного энтальпиметра с термостатируемой колонкой, содержащей иммобилизованный фермент [20]. В этих системах тепло переносится жидкостью, проходящей через колонку мимо термодатчика, вмонтированного в верхнюю часть колонки или на ее выходе.

При использовании проточных устройств дополнительным преимуществом является возможность непрерывного анализа. Большинство подобных приборов имеет довольно близкие характеристики. Как установлено по реакциям с известной энтальпией (табл. 29.1) или с помощью электрической калибровки [6], 80% тепла, выделяющегося в таких «полуадиабатических» приборах, можно обнаружить в виде изменения температуры. При концентрации данного субстрата 1 мМ и изменении энтальпии на 80 кДж/моль можно ожидать, что высота пика будет соответствовать не менее 0,01°С. Тогда, чтобы обеспечить точность 1%, требуется чувствительность по температуре порядка 0,0001°С. Как уже отмечалось, большинство ферментативных реакций сопровождается значительным выделением тепла (в интервале 25–100 кДж/моль), поэтому измерение концентраций порядка 0,1 мМ не должно представлять особых трудностей.

29.2. Оборудование и методика эксперимента

29.2.1. Аппаратура

В работе [7] был впервые описан разработанный авторами ферментный термистор. Схема последнего варианта этого прибора приведена на рис. 29.1. На рис. 29.2 показано все необходимое для ферментного термоанализа оборудование. В алюминиевом цилиндре с контролируемой температурой (25; 30 или 37°С), помещенном в изолирующую рубашку из полиуретана, находится другой алюминиевый цилиндр, отделенный от первого тонкой прослойкой воздуха, до некоторой степени обеспечивающей термическую изоляцию. Тепло передается между двумя блоками в основном путем конвекции жидкости, перекачиваемой из главного теплообменника во внешнем цилиндре в короткий вспомогательный теплообменник во внутреннем цилиндре. Таким образом, колонки окружены средой с в высокой степени постоянной температурой.

Большая часть тепла, выделяющегося в колонке с ферментом, уносится потоком жидкости. Температуру на выходе колонки измеряют небольшим термистором, смон-

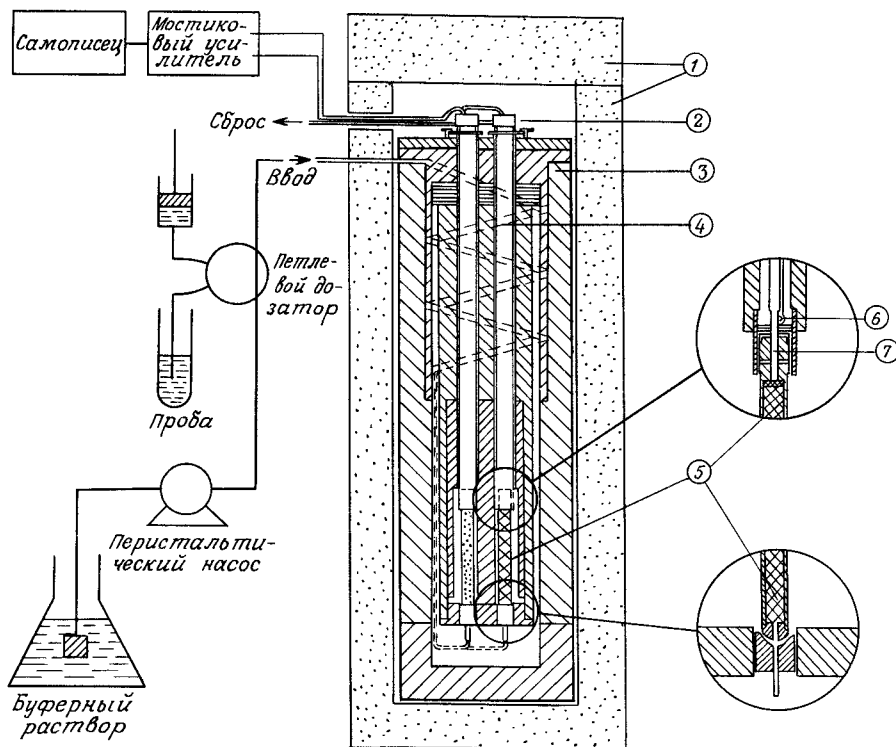


Рис. 29.1. Поперечное сечение ферментного термистора в термостатируемой алюминиевой рубашке. 1—полиуретановая изоляция; 2—вводы плексигласовой трубки и термисторного датчика; 3—термостатируемый алюминиевый цилиндр; 4—теплообменник; 5—колонка с ферментом; 6—термистор, прикрепленный к капиллярной золотой трубке; 7—выход колонки. В корпусе имеются два одинаковых отверстия для ввода колонок, одно из которых можно использовать как канал сравнения (в системе с разделением потока).

тированным в короткой капиллярной трубке из золота. Обычно используют двухшариковый термистор (A395, фирма Victory Engineering Corp., Спрингфилд, Нью-Джерси, США) с сопротивлением 16 кОм при 25°C и температурным коэффициентом — 3,95%/град. Кроме того, во внутренний блок вмонтирован эталонный термистор для дифференциальных измерений, что повышает стабильность нулевой линии.

Температуру регистрируют при помощи мостика постоянного тока Уинстона со стабилизированным усилителем и прецизионными проволочными резисторами с низким температурным коэффициентом. При максимальной чувствительности моста изменение сигнала самописца составляет 100 мВ при изменении температуры на 0,001°C. На практике предельная чувствительность системы обычно ниже (порядка 0,01°C). Она определяется главным образом флуктуациями температуры, вызываемыми трением и турбулентностью потока в колонке. Отметим, что во многих реакциях изменению концентрации субстрата от 0,5 до 1 мМ соответствует изменение температуры на 0,01°C. За последние 5 лет в нашем институте изготовлено более 15 приборов, аналогичных изображенным на рис. 29.2. Эти приборы используют в различных лабораториях.

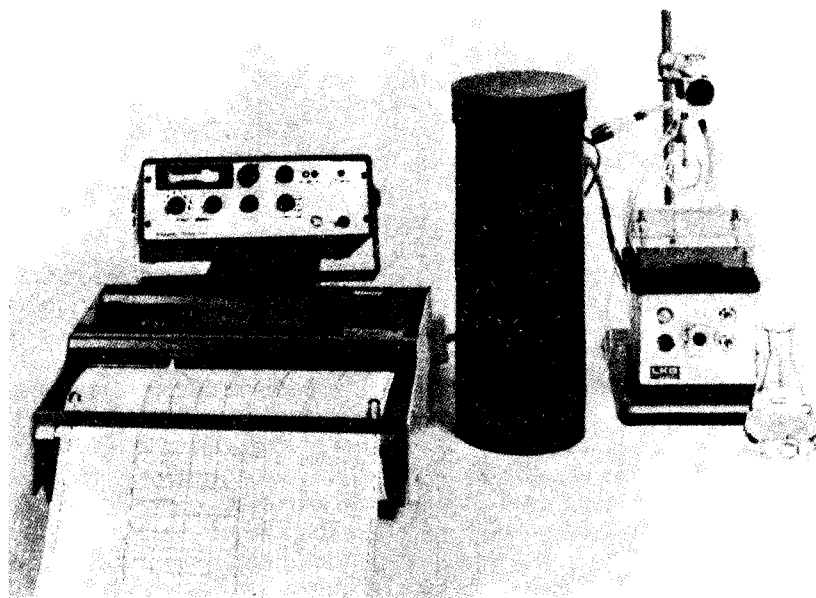


Рис. 29.2. Ферментный термистор с ручным управлением.

29.2.2. Колонка с ферментом

Смена колонок осуществляется очень легко: колонку просто вставляют в нижний конец пластиковой трубки, служащей для установки колонки в прибор и содержащей выходной патрубком и термодатчик. Можно использовать колонки различного диаметра (максимальный внутренний диаметр 7 мм) и высоты ферментного слоя (максимум 30 мм). Носителем фермента может служить нейлоновая трубка, намотанная на специальный адаптер, который вставляется в держатель колонки и связывает трубку с проточной системой. Нейлоновая трубка удобна для анализа неочищенных проб, содержащих твердые частицы [27], но имеет низкую ферментную емкость. Обычно в качестве носителя используют пористое стекло с контролируемым размером пор, которое не только обладает высокой ферментной емкостью, хорошей механической прочностью, химической и микробной устойчивостью, но и позволяет применять сравнительно простые методики иммобилизации фермента. В ряде работ [7, 31] применяли и другие материалы. Разные носители существенно различаются по способности к адсорбции компонентов анализируемых растворов, что зависит, например, от реального распределения на их поверхностях ионных и гидрофобных групп. Поскольку такая адсорбция почти наверняка вызывает неспецифическое выделение тепла и даже может влиять на ферментативную реакцию, выбор материала носителя весьма существен. Хорошие результаты получаются при использовании пористого стекла с размерами пор от 500 до 2000 Å и частиц — около 80 меш. Если используют необработанное или обработанное алкилпропиламином пористое стекло, полученное из разных источников, активация стекла глутаровым альдегидом с последующей иммобилизацией фермента почти всегда дает хорошие результаты. Следует отметить, что обычно в колонку термистора вводят довольно большой избыток фермента (нередко 100 ед. активности). Эта процедура обеспечивает стабильность работы и неизменность характеристик системы при большом числе проб и в случае длительных

непрерывных измерений. Колонка должна нормально функционировать в течение нескольких месяцев.

29.2.3. Методика анализа

Оборудование для ферментного термисторного анализа может включать неактивную колонку сравнения для компенсации неспецифического выделения тепла. Такая система с разделением потока [25] эффективна при анализе неочищенных проб (например, при определении триглицеридов [31]), но во многих случаях неспецифические эффекты можно исключить тщательным планированием методики анализа, предотвращая колебания состава растворителя (т.е. стабилизируя теплоты смешения и растворения) и адсорбцию макромолекул и микроорганизмов.

Буферный раствор непрерывно прокачивают через каждый рабочий канал со скоростью 0,5–3,0 мл/мин. Обычно пробы вводят короткими импульсами через хроматографический клапан с петлей объемом от 0,1 до 1 мл. При коротких импульсах термически стационарное состояние не достигается, но ферментативная реакция дает температурный пик, высоту которого обычно и принимают за меру концентрации субстрата [7].

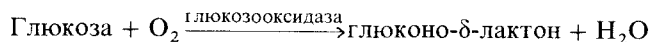
Если нет ограничений по концентрации реагентов (активность оксидазы, например, определяется подачей кислорода) или по каким-либо другим факторам, то линейная зависимость высоты пика от концентрации субстрата наблюдается в диапазоне от 10^{-5} до 10^{-1} М. Максимальное число проб фиксированного объема, которое может быть проанализировано данной системой, составляет от 15 до 60 проб в час. Последнее значение получено при анализе проб малого (до 0,1 мл) объема с повышенной (до 2–3 мл/мин) скоростью течения. Для упрощения дозировки проб использовали модифицированный пробоотборник Auto Analyzer (фирма Technicon Instruments Corp., Территаун, Нью-Йорк, США), соединенный через интерфейс с небольшим настольным компьютером, который также контролирует дозировочный клапан. Такая система может работать без присмотра, например, всю ночь. Если набор проб включает стандарты для градуировки, то компьютер программирует на расчет концентрации каждой пробы по высоте или площади пика. С увеличением длительности импульсного вывода пробы более 1–5 мин температурный сигнал постепенно достигает постоянного значения, пропорционального концентрации. Следовательно, концентрацию субстрата можно регистрировать непрерывно.

29.2.4. Усиление теплового сигнала

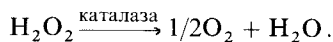
Для усиления выделения тепла имеются различные приемы. Молярная энтальпия многих ферментативных реакций достаточно высока, и поэтому можно использовать такой прибор, как ферментный термистор с чувствительностью к субстрату порядка 10^{-5} М. Однако в некоторых реакциях, например при ферментативном гидролизе эфиров, тепла выделяется очень мало, а при гидролизе ацетилхолина, катализируемом холинэстеразой, изменение энтальпии вообще близко к нулю. Тем не менее такие реакции можно детектировать калориметрически. Дело в том, что на стадии гидролиза выделяется протон, который может протонировать компоненты буферного раствора с высокой энтальпией (например, для Трис-буфера $\Delta H = -47,5$ кДж/моль [30]), и процесс в целом становится экзотермическим. В работе [30] ферментный термистор с иммобилизованным трипсином использовали как в Трис-, так и в фосфатном буферном растворе ($\Delta H = -4,7$ кДж/моль).

Чувствительность можно повысить также соиммобилизацией последовательно действующих ферментов. Каждая ступень реакции вносит вклад в регистрируемый

температурный сигнал, так что последний определяется суммой энтальпий всех реакций. Например, чувствительность определения глюкозы с глюкозооксидазой по реакции



можно повысить вдвое, введя в колонку ферментного термистора каталазу:



В последней реакции регенерируется половина кислорода, потребляемого в реакции с глюкозооксидазой, и за счет этого верхняя граница диапазона определяемых концентраций повышается от 0,45 до 0,7 мМ. Преимуществами соиммобилизованных последовательно действующих ферментов являются также более быстрое превращение субстрата по сравнению с ситуацией, когда фермент иммобилизован на отдельных полимерных шариках, а также большая эффективность при низкой концентрации субстрата.

Если первая реакция слабо экзотермична, соответствующий ей фермент можно помещать в предколонку, находящуюся снаружи ферментного термистора, оставив внутри калориметра только фермент(ы), катализирующие последующие реакции. Это позволяет увеличить гибкость системы и повышает ее суммарную производительность, поскольку можно использовать более эффективные колонки с ферментами, особенно на первой стадии. Таким способом с помощью β -глюкозооксидазы определяли целлюлозу [12], а с помощью β -галактозидазы – лактозу [24]. Поскольку энтальпия гидролиза очень мала, для термических измерений использовали образующуюся при гидролизе глюкозу, окисляя последнюю в ферментном термисторе с глюкозооксидаза/каталазной колонкой.

Чувствительность калориметрического метода можно существенно повысить *рециклированием субстрата*, например, если оксидаза и дегидрогеназа действуют на одну и ту же пару субстрат/продукт. Недавно показано, что, используя лактатоксидазу и каталазу, соиммобилизованные с лактатдегидрогеназой, чувствительность определения лактата или пирувата можно повысить в 1000 раз [40]. Проходя через колонку, лактат многократно окисляется лактатоксидазой, а пируват восстанавливается лактатдегидрогеназой до лактата, расходуя при этом NADH. Полное изменение энтальпии здесь примерно то же, что и при окислении NADH кислородом, которое представляет собой сильно экзотермическую реакцию (см. табл. 29.1). На колонке объемом 0,8 мл при объеме пробы 0,5 мл и скорости потока 1 мл/мин этим методом можно определять лактат и пируват в концентрации до 10 нМ. В системе с соиммобилизованной парой лактатдегидрогеназа/глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа за счет рециклирования чувствительность к NADH можно увеличить в 80 раз.

29.3. Практические приложения

Ферментные термисторы и аналогичные им устройства успешно используют во многих областях биоанализа, например в клиническом анализе, контроле технологических, в том числе ферментационных процессов, контроле загрязнения окружающей среды. Недавно показана возможность их применения при хроматографическом определении ферментов в сложных смесях. Кроме того, на основе ферментного термистора разработана проточная система для иммуноанализа. В табл. 29.2 охарактеризовано большое число анализов, выполненных с помощью ферментных калориметров. Правда, следует иметь в виду, что некоторые из цитируемых здесь работ

Таблица 29.2. Определение веществ при помощи ферментных термисторов

Вещество	Иммобилизованный биокатализатор	Диапазон определяемых концентраций, ммоль/л	Литература
<i>Клинический анализ</i>			
Аскорбиновая кислота	Аскорбатоксидаза	0,05–0,6	[24]
АТФ	Апираза	1–8	[30]
Холестерин	Холестериноксидаза	0,03–0,15	[7]
Эфиры холестерина	Холестериноксидаза + холестеринэстераза	0,03–0,15	[7]
Креатинин	Креатининиминогидролаза	0,01–10	[7]
Глюкоза	Глюкозооксидаза + каталаза	0,002–0,8	[8, 20, 22, 41]
Глюкоза	Гексокиназа	0,5–25	[2]
Лактат	Лактат-2-монооксигеназа	0,005–2	[7]
Щавелевая кислота	Оксалатоксидаза	0,005–0,5	[44]
Щавелевая кислота	Оксалатдекарбоксилаза	0,1–3	[7]
Триглицериды	Липопроteinлипаза	0,1–5	[38]
Мочевина	Уреаза	0,01–500	[2, 9, 14, 37, 42]
Мочевая кислота	Уриказы	0,05–4	[7]
<i>Определение растворимых ферментов</i>			
Мочевина	Уреаза (растворимая)	0,1–100 ед./мл	[6]
H ₂ O ₂	Каталаза (растворимая)	0,1–100 ед./мл	[6]
Глюкоза + АТФ	Гексокиназа (растворимая)	0,1–2,5 ед./мл	[12]
<i>Иммунологический анализ (ТФИСА)</i>			
Альбумин (антиген)	Иммобилизованные антители + меченный ферментом антиген	10 ⁻¹⁰	[26]
Гентамицин (антиген)	То же	> 0,1 мкг/мл	[7]
Инсулин (антиген)	»	0,1–1,0 ед./мл; 0,1–50 мкг/мл	[1]
<i>Контроль ферментационных процессов</i>			
Целлобиоза	β-Глюкозидаза + глюкозооксидаза + каталаза	0,05–5	[11]
Цефалоспорин	Цефалоспориноаза	0,005–10	[7]
Этанол	Алкогольоксидаза	0,01–1	[18]
Галактоза	Галактозооксидаза	0,01–1	[24]
Лактоза	Лактаза и глюкозооксидаза + каталаза	0,05–10	[24]
Пенициллин	Пенициллиназа	0,05–500	[13, 27]
Сахароза	Инвертаза	0,05–100	[24]

выполнены довольно давно, так что указанные в них диапазоны определяемых содержаний могли бы быть значительно расширены при использовании современного оборудования.

29.3.1. Термический ферментный иммуносорбентный анализ

Ферментный термистор можно успешно применять в быстроразвивающейся области иммунохимического анализа — для определения антигенов и антител. Этот метод авторы предложили назвать «термическим ферментным иммуносорбентным анализом» (ТФИСА) [26]. Колонку ферментного термистора заполняют иммуносорбентом, например Сефарозой CL-4В с иммобилизованными антителами. При определении антигена в проточную систему вводят антиген, меченный ферментом (например, каталазой). Количество удерживаемого в колонке меченного каталазой фермента зависит от содержания антигена. Чем меньше его в пробе, тем больше меченого антигена будет обнаружено в колонке и, следовательно, тем больше тепла выделится при последующем вводе в поток пероксида водорода, субстрата каталазы. В настоящее время чувствительность метода ТФИСА достигает 10^{-13} М. После анализа иммуносорбент нетрудно регенерировать промыванием глицином при низких рН; полный цикл измерения занимает всего 10–15 мин. Преимущество метода состоит в том, что с его помощью можно быстро и просто анализировать единичные разнородные пробы. Для использования в биотехнологии, например для контроля производства гормонов и белков микроорганизмами, трансформированными методами генной инженерии, удобен разработанный авторами [1] автоматизированный вариант ТФИСА. В этом варианте клапаны, регулирующие потоки анализируемого раствора, раствора субстрата и промывочных растворов, управляются программируемым контроллером. Продолжительность цикла составляет 5 мин; пробы можно отбирать из технологических потоков или перемещать отобранные пробы к прибору с помощью транспортера.

29.3.2. Применение в клинической медицине

Описано несколько рутинных методов определения мочевины в сыворотке крови при помощи иммобилизованной уреазы [2, 9, 14, 37, 42]. Диапазон линейности этих методов весьма широк — от 0,01 до 200 ммоль/л [9]. Поскольку пробы сыворотки обычно разбавляли в 10 раз, концентрации в основном попадали в интервал 0,3–10 ммоль/л. В результате имелся значительный запас активности фермента, поэтому можно было ожидать, что стабильность работы системы будет высокой. Колонку с ферментом можно использовать несколько месяцев или для анализа нескольких сотен проб сывороток. На проведение одного анализа требуется всего 2–3 мин, что вполне приемлемо для небольшой серии проб. Точность измерений также вполне удовлетворительна (относительное стандартное отклонение ~1%).

Для определения глюкозы применяют либо гексокиназу, либо глюкозооксидазу с каталазой. Растворимую гексокиназу использовали в энталпиметрическом методе с прямым вводом проб для определения глюкозы в диапазоне 0,5–50 ммоль/л [29]. Применение аналогичной системы с иммобилизованной гексокиназой давало возможность определять концентрации глюкозы в диапазоне 0,5–25 ммоль/л [2]. Учитывая высокую производительность (40 проб/час), точность, а также долговременную стабильность и воспроизводимость, рассматриваемую систему можно считать в высокой степени приемлемой в качестве рутинного инструмента для клинического определения глюкозы.

Вместо гексокиназы удобнее использовать глюкозооксидазу, так как последняя более стабильна и не нуждается в кофакторе [8]. Недостатком данной системы является, однако, то, что отклик линеен лишь до 0,45 ммоль/л, а при соиммобилизации глюкозооксидазы и каталазы — до 0,7 ммоль/л. Этот недостаток можно преодолеть, разбавляя пробы в 50–100 раз или вводя малые объемы сыворотки (5–20 мкл) прямо в поток буферного раствора, входящий в ферментный термистор. В результате дости-

гается достаточно высокая точность – в течение дня относительное стандартное отклонение составляло 0,6% как для одноколоночного, так и для двухколоночного прибора. Концентрации глюкозы, найденные при помощи ферментного термистора, хорошо согласуются с величинами, полученными обычным спектрофотометрическим ферментным методом, используемым в медицинской диагностике. Стабильность работы описанной системы была по крайней мере не хуже, чем у уреазного термистора. Аналогичные результаты получены в работе [41], где также использовали соиммобилизованные глюкозооксидазу и каталазу, а также в работе [22], где оба фермента иммобилизовали на волокне, что привело к расширению линейного диапазона, правда, за счет некоторого снижения чувствительности и, возможно, стабильности работы прибора.

Используя вместо кислорода другой акцептор электронов, бензохинон, можно значительно расширить диапазон линейности отклика глюкозооксидазной системы. Введение 45 ммоль/л бензохинона в рабочий буферный раствор приводит к расширению этого диапазона от 0,1 до 70 ммоль/л [20].

Глюкозооксидаза/каталазный термистор в комбинации с ферментом, расщепляющим дисахариды, можно использовать для определения глюкозосодержащих дисахаридов (например, целлобиозы [12] и лактозы [24]). Кроме того, сахарозу можно непосредственно определять с помощью инвертазы (ЕС 3.2.1.26) в диапазоне 0,05–100 ммоль/л [24]. Этот пример показывает одно из преимуществ ферментного термистора: он позволяет осуществлять прямой контроль за последней реакцией без какой-либо другой сопряженной реакции, что невозможно в других методах, например фотометрических. Можно упомянуть еще два метода: галактозооксидазу (ЕС 1.1.3.9) используют для определения галактозы, а аскорбатоксидазу (ЕС 1.10.3.3) – для определения витамина С с диапазоном линейности 0,05–0,6 ммоль/л [24].

Определение триглицеридов [38] является наглядным примером ферментной калориметрии с использованием только одного фермента там, где в большинстве других

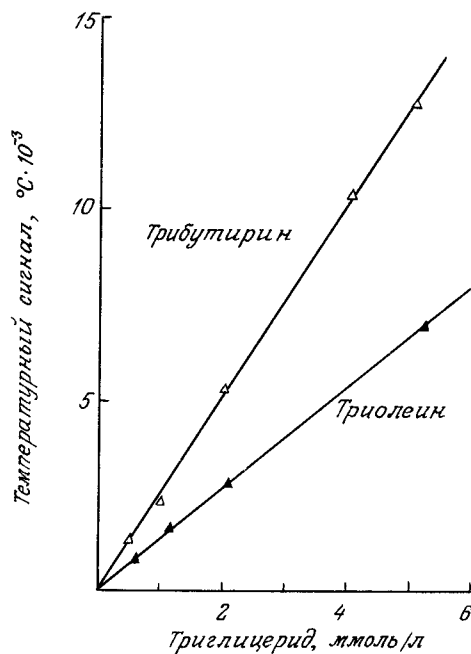


Рис. 29.3. Градуировочные кривые ферментного термистора с разделением потока. В колонке термистора содержалась липопротеаза, иммобилизованная на пористом стекле.

методов потребовалось бы несколько ферментов. Липопротеинлипазу (ЕС 3.1.1.34) иммобилизовали на пористом стекле с размером пор 2000 Å. Анализ проводили в системе с разделением потока в 0,1 М буферном растворе Трис (рН 8,0), содержащем 0,5% Тритон Х-100. Температурный отклик системы был линейен для 0,05–10 ммоль/л трибутирина и 0,1–5 ммоль/л триолеина (рис. 29.3). Концентрацию триглицерида в сыворотке определяли после ее двукратного разбавления буферным раствором Трис (до концентрации 3 ммоль/л). Результаты анализов хорошо коррелируют с данными, полученными обычными спектрофотометрическими методами.

Еще одним примером для определения фосфолипидов использовали три последовательно действующих фермента: фосфолипазу D, холиноксидазу и каталазу. Растворимую в воде фосфолипазу D (36 ед. активности) добавляли непосредственно в пробу объемом 0,05 мл, которую затем вводили в поток буферного раствора (1 мл/мин, 0,1 М Трис·HCl, рН 8,0, 15 mM CaCl₂, 0,5% Тритон Х-100). Ферментная колонка была заполнена холиноксидазой и каталазой, соиммобилизованными на пористом стекле. Область линейности отклика охватывала концентрации от 0,03 до 0,19 mM. Сыворотку можно было анализировать непосредственно после 10-кратного разбавления, причем получаемые результаты хорошо коррелировали с данными обычных методов. Соиммобилизация всех трех ферментов приводила к довольно низкой стабильности работы системы, тем не менее каждую колонку можно было использовать в течение восьми недель или проводить не меньше 1600 анализов.

В настоящее время авторы изучают возможности использования ферментных термисторов в биотехнологии, в частности для определения лактата в бродильном бульоне. Этот метаболит также представляет клинический интерес. Используя лактат-2-монооксигеназу (ЕС 1.1.3.12.4), иммобилизованную на пористом стекле, можно определять концентрации лактата как в стандартных водных растворах, так и в биологических средах с высокой чувствительностью и воспроизводимостью в диапазоне концентраций 0,005–3 ммоль/л (диапазон линейности отклика 0,5–1 ммоль/л). Сравнение калориметрического и электрохимического методов определения лактата показало, что ферментный термистор обладает большей чувствительностью, чем полярографический кислородный электрод в проточной ячейке, соединенной с лактатоксидазной колонкой того же типа, что и в ферментном термисторе (B. Daniellson, I. Sato, V. Mattiasson, неопубликованные данные).

В настоящее время стала вполне доступной оксидаза из *Pedococcus pseudomonas* (ЕС.1.1.3.2). Использование ее в описанных выше системах с рециклированием [40] позволяет достичь чрезвычайно высокой чувствительности (10 нМ). Разумеется, этот фермент можно использовать в ферментном термисторе, лучше в сочетании с каталазой, как в системе глюкозооксидаза/каталаза.

Разработана также методика калориметрического определения щавелевой кислоты в моче и сыворотке крови. Фирма Boehringer Mannheim производит фермент оксالاتоксидазу (ЕС.1.2.3.4). С этим препаратом, а также ферментом, выделенным авторами из ростков ячменя, получены весьма обнадеживающие результаты. Концентрацию щавелевой кислоты в диапазоне 0,01–0,5 ммоль/л можно определять прямо в моче, разбавленной в 5–10 раз [44]. Этот метод пригоден и для анализа пищевых продуктов.

Быстрое ферментативное определение этанола представляет интерес как для клинической химии, так и для биотехнологии. В одной из недавних работ [18] сравнивали результаты определения спирта ферментным электродом на основе полярографического кислородного электрода и ферментным термистором; в обоих случаях использовали один и тот же фермент – алкогольоксидазу из *Candida boidini* (ЕС 1.1.3.13). Стабильность алкогольоксидазы на пористом стекле в ферментном термисторе за-

метно повышалась при соиммобилизации каталазы. Последняя непрерывно удаляет образующийся пероксид водорода (в данном случае мешающий) и одновременно возвращает половину израсходованного кислорода; в результате выделение тепла возрастает вдвое. Оба метода имеют одинаковую чувствительность при определении кислорода в крови. Термисторный датчик позволяет определять до 0,2 ммоль/л этанола (при линейности сигнала до 2 ммоль/л) с погрешностью 1,5%. Помимо этанола, оба метода дают хорошие результаты при определении метанола, пропанола и бутанола.

29.3.3. Определение активности фермента

При незначительной модификации проточной системы ферментный термистор можно использовать для определения активности растворенного фермента. Исследуемый раствор фермента и раствор соответствующего субстрата (в относительном избытке) пропускают порознь через теплообменник; затем их смешивают, быстро пропускают через один из коротких внутренних теплообменников для устранения тепла, выделяемого при смешении растворов, и направляют в реакционную камеру (объемом ~ 1 мл). Последняя устанавливается вместо обычной ферментной колонки и представляет собой либо неактивную колонку, либо тефлоновую трубку, образующую «реакционную спираль». Температуру на выходе реакционной камеры непрерывно измеряют одним из термисторных датчиков, как описано в разделе 29.2. Для большого числа разных ферментов обнаружена линейная корреляция между температурным откликом и активностью фермента [6]. Чувствительность метода – 0,01–0,1 ед. активности/мл в зависимости от типа фермента. Калориметрическое определение активности растворенных ферментов может представить интерес для клинического анализа, а также для контроля процессов очистки ферментов. Хотя абсолютная чувствительность этого метода невелика, он имеет свои достоинства, так как позволяет проводить прямые непрерывные измерения в потоке. Его можно применять для анализа неочищенных проб, расходуя недорогие субстраты (здесь нет необходимости в дорогостоящих субстратах, дающих окрашенные продукты).

29.3.4. Калориметрический контроль в хроматографии

Ферментный термистор успешно применяют в качестве инструмента специфического контроля в гель-фильтрации, ионообменной и аффинной хроматографии [11]. Поскольку ферментный термистор можно использовать для непрерывного определения активности ферментов непосредственно в неочищенных пробах, с его помощью можно идентифицировать и локализовать отдельные компоненты сложной хроматограммы, например на начальных стадиях процесса очистки фермента (рис. 29.4). Кроме того, в аффинной хроматографии при элюировании ферментами часто сопутствуют их коферменты, сильно поглощающие в УФ-области, что затрудняет непрерывный контроль за содержанием фермента по УФ-спектрам или спектрофотометрически регистрируемым изменениям концентрации NAD(P)H. Таким образом, в аффинной хроматографии калориметрическое определение активности элюированного фермента имеет определенные преимущества.

29.3.5. Контроль технологических и ферментационных процессов

Одна из наиболее перспективных областей применения термических биоанализаторов – контроль технологических и ферментационных процессов. Можно ожидать, что по мере развития биотехнологии интерес к прямым методам непрерывного опре-

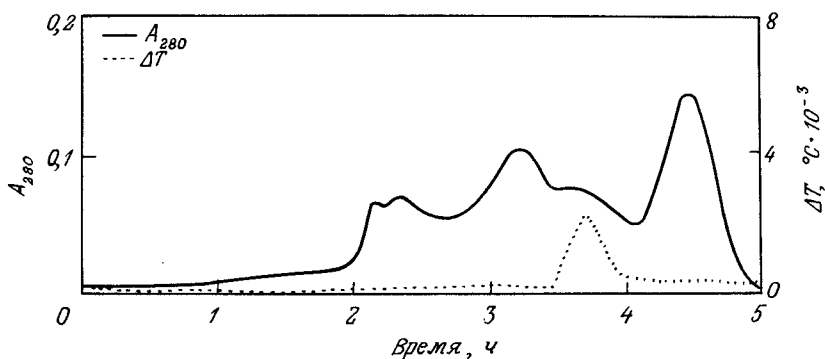


Рис. 29.4. Гель-фильтрация 1 мл неочищенного экстракта дрожжей на колонке с ультрагелем АсА 44; элюент—0,2 М раствор Трис·НСl + 0,0133 М MgCl₂, рН 7,8; скорость потока 0,75 мл/мин. Для анализа на ферментном термисторе с гексокиназой (пунктирная линия) выходящий из колонки поток смешивали с раствором субстрата, содержащим 0,54 М глюкозы и 0,011 М АТФ, скорость потока составляла 0,2 мл/мин [11]. (Приведено с разрешения издательства Academic Press, Орландо, Флорида, США.)

деления специфических компонентов, образующихся или расходуемых в ходе какого-либо процесса, будет возрастать. За исключением методов определения физических переменных, таких как рН, pO_2 и pCO_2 , в большинстве аналитических методов, используемых в настоящее время, контроль за протеканием процесса осуществляется дискретно и автономно. Технологи, однако, предпочитают непрерывные методы контроля, осуществляемые на линии. Такие методы не только более информативны, но позволяют снизить расходы на отбор проб и содержание персонала. Опыт, полученный в этой области, используется и в медицине, например при мониторинге *in vivo*. Возможности применения ферментных термисторов для непрерывных измерений и контроля исследовали в ряде работ. Так, в работе [6] с помощью ферментного термистора контролировали состав жидкости на выходе ферментного реактора, содержащего β-галактозидазу. Лактоза молочной сыворотки, прокачиваемой

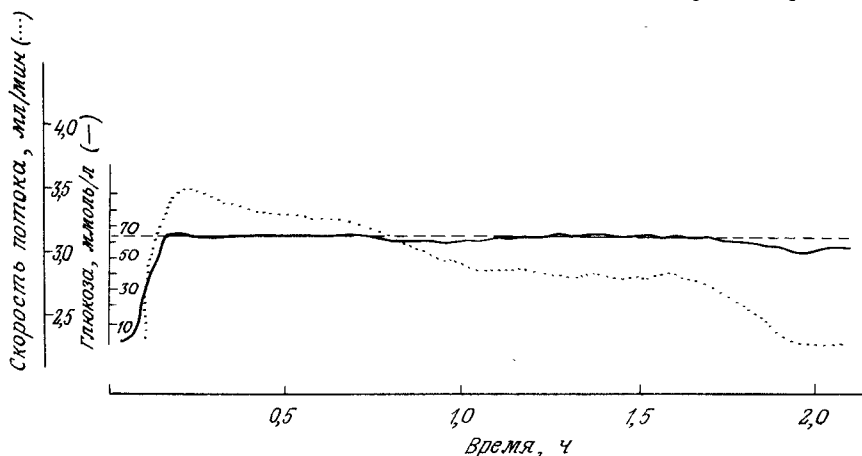


Рис. 29.5. Изменение во времени концентрации глюкозы, измеряемой термистором на основе системы глюкозооксидаза/каталаза (—), и скорости прокачки сыворотки, содержащей 150 мМ лактозы, через проточный реактор с лактазой, иммобилизованной на сефарозе (...) [6]. (Приведено с разрешения издательства John Wiley and Sons, Нью-Йорк, США.)

через реактор, гидролизовалась до глюкозы и галактозы; концентрацию глюкозы в выходящем потоке жидкости измеряли ферментным термистором с глюкозооксидаза/каталазной системой (рис. 29.5). Поток субстрата через реактор регулировали тепловым сигналом термистора с помощью пропорционального интегрального контроллера. Таким образом, содержание продукта (т.е. глюкозы) в выходящем потоке можно было поддерживать на постоянном уровне даже при засорении колонки.

Как уже упоминалось, для ряда сахаров разработаны методы непрерывного определения в потоке. Авторы исследовали несколько вариантов контроля технологических процессов, в которых участвуют такие сахара [21, 28]. Оказалось, что ферментный термистор работает достаточно стабильно и может непрерывно использоваться в течение нескольких дней без смены ферментной колонки или переработки. Рекомендуется только один раз в день проверять базовую линию системы. При наличии аналогового контроллера и компьютера система довольно быстро (за 1–3 мин) реагирует на внезапные изменения концентрации сахара. Тот же подход можно в принципе использовать для контроля глюкозы в крови пациента: при этом доза инсулина определяется сигналом ферментного термистора, непрерывно измеряющего уровень глюкозы в крови.

В работе [27] пенициллин, присутствующий в бродильном бульоне, определяли с помощью системы с иммобилизованной пенициллиназой (β -лактамазой). При иммобилизации фермента на пористом стекле диапазон определяемых концентраций охватывал по меньшей мере от 0,01 до 100 ммоль/л. В качестве носителя фермента опробовали также нейлоновую трубку. На рис. 29.6 результаты определения пенициллина G в пробах бродильного бульона нанесены на градуировочную кривую для области низких концентраций. Коэффициент корреляции результатов, полученных калориметрическим и стандартным методом, составляет 0,997. Определение пенициллина ферментным термистором в производстве антибиотиков имеет явное преимущество по сравнению с обычно используемыми методами, такими как высокоэффективная жидкостная хроматография и фотометрия. Несколько примеров успешного применения калориметрических методов вместо обычных приведено в работе [13].

В ферментационных производствах приходится анализировать большей частью сложные системы, содержащие разного рода частицы вещества. Чтобы избежать засорения анализатора, рекомендуется предотвращать попадание частиц на вход анализатора. С этой целью можно использовать диализную мембрану (например, такую, как в автоанализаторе фирмы Technicon [12]) либо иммобилизовать ферменты на внутренней поверхности нейлоновой трубки (вместо обычной колонки). В первом

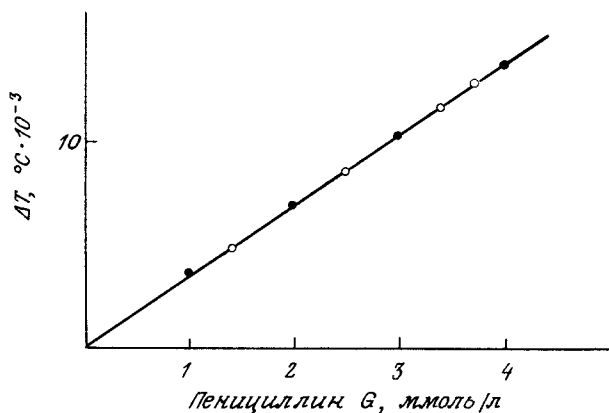


Рис. 29.6. Градуировочная кривая для определения пенициллина G в 0,3 М буферном растворе фосфата натрия, pH 7,0 (●) и данные для проб, содержащих известные количества пенициллина в разбавленном в 10 раз бродильном бульоне (○). Объем пробы 1 мл, скорость потока 1 мл/мин. Колонка ферментного термистора содержала пенициллиназу, иммобилизованную на пористом стекле.

случае может возникнуть необходимость соблюдения высокой стерильности процесса ферментации. Во втором – сужается диапазон линейности, так как ферментная емкость наилоновой трубки меньше, чем у пористого стекла. К тому же чувствительность системы с пористым стеклом довольно высока, так что степень разбавления можно увеличить. Это, очевидно, третий способ решения проблемы засорения. Используя ферментный термистор, можно не только непрерывно контролировать концентрацию продукта (например, образование пенициллина в процессе ферментации) и субстрата (например, потребление глюкозы), но одновременно регистрировать и все изменения температуры в микробиологическом процессе, получая в итоге термограмму (кривую зависимости тепловая мощность – время), дающую ценную дополнительную информацию [7]. В этом случае суспензию микроорганизмов смешивают с раствором субстрата и измеряют повышение температуры в ходе реакции. Аналогичный метод используют для калориметрического определения активности фермента.

29.3.6. Анализ объектов окружающей среды

Термоанализ можно применять также и для эпизодического или непрерывного наблюдения за окружающей средой [7] как своего рода антитоксический контроль. При необходимости детектирования определенного токсического соединения в ферментной колонке термистора можно иммобилизовать определенное количество фермента, который ингибируется данным соединением. Тяжелые металлы, например Hg(II), можно обнаружить уже при содержании до $0,2 \cdot 10^{-7}\%$ по их ингибирующему действию на иммобилизованную уреазу [7]. Концентрацию тяжелых металлов в пробе определяют сравнением температурного отклика на импульсный ввод субстрата (с избытком мочевины) до и после введения пробы. Затем специальной промывкой полностью восстанавливают активность уреазы, что позволяет проводить повторные анализы на той же ферментной колонке. В некоторых случаях можно применять ферменты, которые действуют непосредственно на определяемое вещество. Так, цианид определяют с пределом обнаружения 10^{-5} М, используя фермент родаминазу. Возможно даже прямое определение пестицидов и ингибиторов ацетилхолинэстеразы [7]. Если требуется определить общее содержание токсических веществ, в колонке термистора можно иммобилизовать ингактные клетки, органеллы и мультиферментные системы. Такие системы позволяют обнаруживать множество потенциально токсичных соединений, так как они влияют на общий метаболизм, приводя к уменьшению выделяющегося тепла.

29.4. Заключение

Несмотря на множество привлекательных свойств, датчики с иммобилизованными ферментами пока редко используют в серийно выпускаемых приборах. До сих пор число нашедших применение систем с ферментными электродами весьма невелико. Стремительное развитие биотехнологии приводит к увеличению потребности в проточных анализаторах для контроля технологических процессов, непрерывного мониторинга ферментационных процессов и анализа в потоке. В этой области иммобилизованные ферменты несомненно найдут широкое применение, поскольку они позволяют осуществлять высокоизбирательные определения в потоке. Иммобилизация ферментов снижает их стоимость и повышает стабильность работы. Особенно удобны термические проточные анализаторы, позволяющие анализировать мутные, содержащие взвешенные частицы или окрашенные пробы. Кроме того, в их основе лежит наиболее общий принцип детектирования, а именно детектирование теплоты реакции. Это позволяет применять их для большинства ферментативных реакций. Тепла,

выделяемого в первичной ферментативной реакции, обычно достаточно, чтобы его можно было надежно измерить. Таким образом, отпадает необходимость во вспомогательных ферментативных реакциях, используемых обычно в других методах анализа (они также часто включают дорогостоящие коферменты, что особенно невыгодно при непрерывном анализе в потоке). Имеются хорошие перспективы использования проточных термоанализаторов в медицинской технике, например в системах для непрерывного контроля метаболизма. Параллельно с весьма сложными и мощными многоканальными системами разрабатываются также небольшие специализированные одноканальные приборы, такие как анализаторы креатина и глюкозы. Очень хорошие проточные анализаторы такого типа могут создаваться на основе ферментных термисторов, как показано в разделе 29.3 на примере оксалатного анализатора.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Birnbaum S., Bülow L., Danielsson B., Hardy K., Mosbach K.* Rapid automated analysis of human proinsulin produced by *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.*, **157**, 1986. In press.
2. *Bowers L.D., Carr P.W.* Immobilized-enzyme flow-enthalpimetric analyzer: application to glucose determination by direct phosphorylation catalyzed by hexokinase. *Clin. Chem.*, **22**, 1427-33 (1976).
3. *Bowers L.D., Canning L.M., Sayers C.N., Carr P.W.* Rapid flow-enthalpimetric determination of urea in serum with use of an immobilized urease reactor. *Clin. Chem.*, **22**, 1314-8 (1976).
4. *Brown H.D.* Calorimetry of enzyme catalyzed reactions. In *Biochemical microcalorimetry* (ed. H.D. Brown), p. 149. Academic Press, New York, 1969.
5. *Cooney C.L., Weaver J.C., Tannenbaum S.R., Faller D.V., Shields A., Jahnke M.* The thermal enzyme probe - a novel approach to chemical analysis. In *Enzyme engineering* (eds. E. K. Pye, L. B. Wingard, Jr.), Vol. 2, p. 411-7. Plenum, New York, 1974.
6. *Danielsson B., Mosbach K.* Determination of enzyme activities with the enzyme thermistor unit. *FEBS Lett.*, **101**, 47-50 (1979).
7. *Danielsson B., Mattiasson B., Mosbach K.* Enzyme thermistor devices and their analytical applications. *Appl. Biochem. Bioeng.*, **3**, 97-143 (1981).
8. *Danielsson B., Gadd K., Mattiasson B., Mosbach K.* Enzyme thermistor determination of glucose in serum using immobilized glucose oxidase. *Clin. Chim. Acta*, **81**, 163-75 (1977).
9. *Danielsson B.* Determination of urea with an enzyme thermistor using immobilized urease. *Anal. Lett.*, **9**, 987-1001 (1976).
10. *Danielsson B., Mattiasson B., Karlson R., Winquist F.* Use of an enzyme thermistor in continuous measurements and enzyme reactor control. *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1749-66 (1979).
11. *Danielsson B., Bülow L., Lowe C.R., Satoh I., Mosbach K.* Evaluation of the enzyme thermistor as a specific detector for chromatographic procedures. *Anal. Biochem.*, **117**, 84-93 (1981).
12. *Danielsson B., Rieke E., Mattiasson B., Winquist F., Mosbach K.* Determination by the enzyme thermistor of cellobiose formed on degradation of cellulose. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **6**, 207-22 (1981).
13. *Decristoforo G., Danielsson B.* Flow injection analysis with enzyme thermistor detector for automated determination of β -lactams. *Anal. Chem.*, **56**, 263-8 (1984).
14. *Fulton S.P., Cooney C.L., Weaver J.C.* Thermal enzyme probe differential temperature measurements in a laminar flow-through cell. *Anal. Chem.*, **52**, 505-8 (1980).
15. *Grime J.K.* Biochemical and clinical analysis by enthalpimetric measurements - a realistic alternative approach? *Anal. Chim. Acta*, **118**, 191-225 (1980).
16. *Grime J.K.* Application of solution calorimetry to biochemical and clinical analyses. In *Analytical solution calorimetry* (ed. J.K. Grime), p. 345. Wiley-Interscience, New York, 1985.
17. *Grime J.K., Tan B.* The determination of some selected penicillins by enzymatic enthalpimetry. *Anal. Chim. Acta*, **107**, 319-26 (1979).
18. *Guilbault G.G., Danielsson B., Mandenius C.F., Mosbach K.* A comparison of enzyme electrode and thermistor probes for assay of alcohols using alcohol oxidase. *Anal. Chem.*, **55**, 1582-5 (1983).
19. *Johansson A., Mattiasson B., Mosbach K.* Immobilized enzymes in microcalorimetry. *Methods in Enzymol.*, **44**, 659-67 (1976).
20. *Kiba N., Tomiyasu T., Furusawa M.* Flow enthalpimetric determination of glucose based on oxidation by 1,4-benzoquinone with use of immobilized glucose oxidase column. *Talanta*, **31**, 131-2 (1984).
21. *Mandenius C.F., Bülow L., Danielsson B., Mosbach K.* Monitoring and control of enzymic sucrose hydrolysis using on-line biosensors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 135-42 (1985).
22. *Marconi W.* Biomedical applications of enzymatic fibres. In *Enzyme engineering* (eds. G. B. Broun, G. Manecke, L. B. Wingard, Jr.), Vol. 4, p. 179-86. Plenum Press, New York, 1978.

23. *Martin C. J., Marini M. A.* Microcalorimetry in biochemical analysis. *CRC Crit. Rev. in Anal. Chem.*, **8**, 221–86 (1977).
24. *Mattiasson B., Danielsson B.* Calorimetric analysis of sugars and sugar derivatives with aid of an enzyme thermistor. *Carbohydr. Res.*, **102**, 273–82 (1982).
25. *Mattiasson B., Mosbach K.* A split-flow enzyme thermistor. *Anal. Lett.*, **9**, 867–89 (1976).
26. *Mattiasson B., Borrebaeck C., Sanfridsson B., Mosbach K.* Thermometric enzyme linked immunosorbent assay: TELISA. *Biochim. Biophys. Acta*, **483**, 221–7 (1977).
27. *Mattiasson B., Danielsson B., Winqvist F., Nilsson H., Mosbach K.* Enzyme thermistor analysis of penicillin in standard solutions and in fermentation broths. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 903–8 (1981).
28. *Mattiasson B., Mandenius C. F., Axelsson J. P., Danielsson B., Hagander P.* Computer control of fermentation with biosensors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **413**, 193–6 (1983).
29. *McGlothlin C. D., Jordan J.* Enzymatic enthalpimetry, a new approach to clinical analysis: glucose determination by hexokinase catalyzed phosphorylation. *Anal. Chem.*, **47**, 786–90 (1975).
30. *Mosbach K., Danielsson B.* An enzyme thermistor. *Biochim. Biophys. Acta*, **364**, 140–5 (1974).
31. *Mosbach K., Danielsson B.* Thermal bioanalyzers in flow streams-enzyme thermistor devices. *Anal. Chem.*, **53**, 83A–94A (1981).
32. *Mosbach K., Borgerud A., Scott M.* Determination of heat changes in the proximity of immobilized enzymes with an enzyme thermistor and its use for the assay of metabolites. *Biochim. Biophys. Acta*, **403**, 256–65 (1975).
33. *Mosbach K., Mattiasson B., Gestrelius S., Srere P. A., Danielsson B.* Theoretical and practical aspects of immobilized multi-step enzyme systems. In *Enzyme engineering* (eds. E. K. Pye, L. B. Wingard, Jr.), Vol. 2, p. 151. Plenum, New York, 1974.
34. *Pennington S. N.* A small volume microcalorimeter for analytical determinations. *Anal. Biochem.*, **72**, 230–7 (1976).
35. *Poe M., Gutfreund H., Estabrook R. W.* Kinetic studies of temperature changes and oxygen uptake in differential calorimeter: The heat of oxidation of NADH and succinate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **122**, 204–11 (1967).
36. *Rehak N. N., Young D. S.* Prospective applications of calorimetry in the clinical laboratory. *Clin. Chem.*, **24**, 1414–19 (1978).
37. *Rich S., Ianiello R. M., Jespersen N. D.* Development and application of a thermistor enzyme probe in the urea-urease system. *Anal. Chem.*, **51**, 204–6 (1979).
38. *Satoh I., Danielsson B., Mosbach K.* Triglyceride determination with use of an enzyme thermistor. *Anal. Chim. Acta*, **131**, 255–62 (1981).
39. *Satoh I., Ogawa T., Danielsson B.* Calorimetric phospholipid determination. *Работа готовится к печати* (1986).
40. *Scheller F., Siegbahn N., Danielsson B., Mosbach K.* High-sensitivity enzyme thermistor of L-lactate by substrate recycling. *Anal. Chem.*, **57**, 1740–3 (1985).
41. *Schmidt H.-L., Krisam G., Grenner G.* Microcalorimetric methods for substrate determinations in flow streams with immobilized enzymes. *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 283–90 (1976).
42. *Tran-Minh C., Vallin D.* Enzyme-bound thermistor as an enthalpimetric sensor. *Anal. Chem.*, **50**, 1874–8 (1978).
43. *Weaver J. C., Cooney C. L., Fulton S. P., Schuler D., Tannenbaum S. R.* Experiments and calculation concerning a thermal enzyme probe. *Biochim. Biophys. Acta*, **452**, 285–91 (1976).
44. *Winqvist F., Danielsson B., Malpote J.-Y., Persson L., Larsson M.-B.* Enzyme thermistor determination of oxalate with immobilized oxalate oxidase. *Anal. Lett.*, **18**, 573–88 (1985).

СПЕКТРОМЕТРИЯ

Глава 30

Оптические сенсоры на основе иммобилизованных реагентов

В. Рудольф Зейц

30.1. Введение

В этой главе будут рассмотрены устройства, которые включают в себя фазу реагента, иммобилизованного на конце одного оптического волокна или пучка волокон. Взаимодействие определяемого компонента с иммобилизованным реагентом приводит к изменению оптических свойств слоя реагента, которое измеряют с помощью оптического волокна. Примером может служить рН-сенсор, полученный иммобилизацией кислотного индикатора на конце пучка оптических волокон.

Такие сенсоры являются продуктом синтеза двух идей. Одна состоит в том, чтобы использовать оптические волокна для прохождения света от спектрометра к образцу и обратно. Другая заключается в использовании иммобилизации как способа, позволяющего использовать химический реагент непрерывно, а не однократно. Хотя обе идеи порознь эксплуатируются многие годы, их сочетание — относительно новый путь, открывающий весьма заманчивые возможности, которые исследователи еще только начали осознавать. Использование оптических волокон позволяет эффективно «перенести спектрометр к образцу», а наличие иммобилизованного реагента делает возможным проведение химических реакций с образцом *in situ*.

Впервые иммобилизованные индикаторы были применены для непрерывных измерений в биологических жидкостях Люберсом и др. в 1975 г. [9]. По аналогии с «электродом» авторы назвали свое устройство «оптодом». Впоследствии Хиршфельд и др. [4] ввели термин «оптрод». Поскольку буква «р» в последнем термине взята из корня слова «электрический», термин «оптод» грамматически более правилен. Однако оптодом называется также одна из разновидностей небольшой бородавчатой амфибии, поэтому более благозвучный термин «оптрод» может стать общепринятым. В этой главе мы тем не менее избегаем обоих терминов, предпочитая наименование «оптические сенсоры».

30.1.1. Диапазон проблем, обсуждаемых в этой главе

В этой главе обобщаются достоинства и ограничения оптических сенсоров по сравнению с электродами. Вкратце описано оборудование, необходимое для системы с оптическим сенсором. Описываются также способы взаимодействия фазы иммобилизованного реагента с определяемым веществом; приведены примеры построенных на этой основе селективных устройств. Мы ограничимся здесь только приборами непрерывного действия и не будем рассматривать системы, в которых иммобилизованный реагент используется однократно. В обсуждение, однако, включены системы, в которых иммобилизованные реагенты служат для непрерывных оптических измерений без оптических волокон, поскольку такие реагенты нетрудно приспособить для функционирования вместе с оптическими волокнами.

В предыдущих обзорах на эту тему рассмотрены биомедицинские приложения всех

типов волоконных оптических сенсоров [17] и общие характеристики химических сенсоров на основе оптических волокон [24].

30.2. Достоинства и ограничения волоконно-оптических сенсоров

Поскольку большинство описанных в литературе к настоящему времени оптических сенсоров чувствительны к веществам, которые можно детектировать и электрохимически, точкой отсчета при оценке оптических сенсоров могут служить электрохимические сенсоры. Однако в общем случае к такому сопоставлению следует относиться с осторожностью. Поскольку оптические сенсоры основаны на совершенно иных принципах, чем электрохимические, относительные преимущества обоих типов сенсоров зависят как от конкретного определяемого вещества, так и от конкретных требований при их применении. В общем случае оптические сенсоры обладают следующими преимуществами по сравнению с электродами:

1) Не требуется «электрода сравнения». (Правда, как отмечается ниже, на практике предпочитают измерять сигнал относительно некоторой опорной величины. С этой целью в фазу реагента добавляют какое-либо стандартное вещество.)

2) Поскольку сигнал является оптическим, на него не воздействуют электрические помехи. Это особенно важно для сенсоров, работающих в электрически замкнутой среде.

3) Фаза иммобилизованного реагента не находится в физическом контакте с оптическим волокном. Это упрощает разработку сенсоров, в которых фазу иммобилизованного реагента можно легко удалить и заменить новой. На практике это, очевидно, важно, так как трудно создать достаточно устойчивую фазу реагента, пригодную для неограниченного использования.

4) Для медицинских исследований *in vivo* оптические приборы более безопасны, чем электрические, в частности, потому, что нет опасности поражения электричеством.

5) В равновесных условиях некоторые определяемые вещества, особенно кислород, можно детектировать оптически и нельзя электрохимически. Поскольку после достижения равновесия для «равновесных» сенсоров не требуется поддерживать подачу анализируемого вещества к поверхности на стационарном уровне, им присуща меньшая чувствительность к флуктуациям температуры и скорости потока по сравнению с амперометрическими электрохимическими сенсорами.

6) Оптические сенсоры могут иметь очень стабильные градуировочные графики, особенно если измеряют отношение интенсивностей при двух различных длинах волн. Например, можно получить стабильно работающий рН-сенсор, измеряя оптически количества кислой и основной форм индикатора и устанавливая связь рН с отношением этих двух величин.

7) Используя несколько иммобилизованных реагентов с различными оптическими характеристиками, можно создать оптические сенсоры для одновременного определения нескольких веществ. Например, в работе [14] описан сенсор, одновременно дающий отклик на O_2 и CO_2 .

8) Проводя измерения при нескольких длинах волн, можно выявить любое изменение оптических свойств фазы иммобилизованного реагента. Это изменение может быть связано с разложением реагента или каким-либо другим процессом, влияющим на способность фазы иммобилизованного реагента адекватно реагировать на состав анализируемого раствора. Эта информация может быть полезна для принятия решения о замене фазы реагента.

Последние три пункта отражают тот факт, что оптические сенсоры потенциально более информативны, чем электрохимические, поскольку они могут давать целый спектр данных. Кроме того, в случае люминесцентных сенсоров дополнительную

информацию можно получить, измеряя время жизни люминесценции. Это ставит перед химиками проблему разработки фаз иммобилизованных реагентов, позволяющих использовать потенциальные преимущества оптических сенсоров. *Если не удастся разработать соответствующие фазы реагента, то преимущества оптических сенсоров не будут реализованы на практике.*

Недостатки оптических сенсоров по сравнению с электрохимическими можно сформулировать следующим образом:

1) На показания оптического сенсора может влиять окружающий свет. Этот эффект можно устранить, предотвратив попадание внешнего света в прибор и/или используя модуляционные методы.

2) Оптические сенсоры часто имеют более узкий динамический диапазон по сравнению с электрохимическими. Например, динамический диапазон рН-электрода больше 10^{12} , тогда как у оптического рН-сенсора он составляет всего 10^2 .

3) Оптические сенсоры являются «экстенсивными» устройствами, сигнал которых зависит от количества реагента. Таким образом, миниатюризация сенсора приводит к уменьшению интенсивности измеряемого сигнала, что в свою очередь осложняет технику измерений.

4) По-видимому, проблемой может быть долговременная устойчивость иммобилизованных веществ, подвергаемых действию падающего света. Устойчивость конкретного реагента зависит от нескольких факторов, в числе которых как реакционная способность самого реагента, так и рабочие характеристики сенсора, в частности температура, интенсивность и длительность освещения. Хотя можно ожидать, что будут разработаны реагентные фазы, устойчивые в течение нескольких дней и недель, вряд ли удастся найти такие фазы, которые будут надежно работать дольше.

5) Время отклика некоторых оптических сенсоров может быть велико из-за необходимости массопереноса определяемого вещества в фазу иммобилизованного реагента или из нее, пока не будет достигнут постоянный уровень сигнала. Время отклика можно сократить, уменьшив фазу реагента, однако это приведет к уменьшению количества оптически активного реагента и, соответственно, интенсивности сигнала.

30.3. Технические вопросы

Оборудование, необходимое для оптических сенсоров, зависит от их назначения. К счастью, биомедицинские приложения в большинстве своем не требуют, чтобы сигнал передавался через оптическое волокно на большое расстояние. Это означает, что степень ослабления сигнала в волокне будет относительно невелика и что в сенсорах можно успешно использовать обычные монохроматические источники света, а не обязательно лазеры, обеспечивающие при необходимости весьма высокую интенсивность света. Это не только снижает стоимость оборудования, но и расширяет возможности выбора фаз иммобилизованных реагентов, поскольку накладывает меньше ограничений на используемые длины волн. В большинстве описанных в литературе оптических сенсоров для биомедицинских приложений, как и в первой серийно выпускаемой химической сенсорной системе на основе волоконной оптики (фирма Cardiovascular Devices Inc.), используют лампы накаливания в качестве источника света и интерференционные фильтры. Для измерения при нескольких длинах волн последовательно вводят в оптический путь различные фильтры либо расщепляют луч света после его возвращения из фазы иммобилизованного реагента.

Иногда в оптических сенсорах в качестве источника света используют аргоновый лазер [13, 23]. Высокая интенсивность света делает возможной миниатюризацию сенсора при сохранении достаточной интенсивности сигнала. Это особенно удобно

в случае иммобилизованных реагентов – производных флуоресцеина, так как излучение аргонового лазера при 488 нм эффективно возбуждает флуоресценцию флуоресцеина.

Хотя, в отличие от электродов, оптические сенсоры не требуют отдельного сенсора сравнения, их эксплуатационные характеристики все же существенно улучшаются, если аналитический сигнал сравнивать с некоторым опорным сигналом. Для этого существует несколько способов. Самый простой из них заключается в прямом измерении интенсивности источника на аналитической длине волны, чтобы компенсировать флуктуации его собственной интенсивности. Более привлекательный подход состоит в использовании сигнала сравнения – интенсивности света, проходящего через иммобилизованный реагент. Это позволяет компенсировать любые изменения в оптических свойствах фазы реагента (например, изменения в рассеянии света в фазе реагента из-за изменения показателя преломления исследуемого образца во времени). В флуоресцентном кислородном сенсоре сигналом сравнения может служить обратное рассеяние возбуждающего света [18]. Другой способ получения сигнала сравнения – это введение в фазу реагента какого-либо флуоресцирующего агента, нечувствительного к определяемому веществу. Там, где это возможно, наилучшим подходом является получение сигнала сравнения от самого иммобилизованного реагента. Например, в pH-сенсоре на основе индикатора, кислая и основная формы которого флуоресцируют при разных длинах волн, можно измерять отношение интенсивности флуоресценции этих двух форм [35]. Такой сигнал сравнения компенсирует не только приборные флуктуации и колебания оптических свойств реагентной фазы, но и изменения количества иммобилизованного индикатора вследствие медленного разложения или некоторых других процессов.

Стоимость и рабочие характеристики оптических сенсоров зависят от типа используемого оптического волокна. Пластиковые волокна наиболее дешевы и безопасны, но они пригодны лишь при длинах волн выше ~450 нм. Стекловолоконные волокна несколько дороже, но зато пригодны для измерений при длинах волн ~380 нм. Для работы при длинах волн ниже 380 нм требуются дуговые лампы как источники света и существенно более дорогие волокна из плавленого кварца. Поэтому для снижения стоимости оптических сенсоров желательно использовать фазы иммобилизованных реагентов, оптические характеристики которых лежат в видимой области. Диаметры волокон обычно составляют от 50 до 200 мкм.

Оптические сенсоры могут иметь несколько различных конфигураций, схематически изображенных на рис. 30.1. На рис. 30.1,а показан прибор с разветвлением, в котором для пропускания света в фазу иммобилизованного реагента и из нее используются отдельные волокна. Реагент иммобилизуют на поверхностях твердых частиц, показанных на рисунке в виде шариков. Трубочатая мембрана, надетая на оба волокна, служит для удержания реагента на месте. Чтобы взаимодействовать с реагентом, определяемое вещество должно продиффундировать через мембрану. Крышечка на конце трубочатой мембраны предотвращает прямое взаимодействие падающего света с исследуемым образцом, устраняя таким образом возможный источник помехи. Твердые частицы носителя служат не только субстратом для иммобилизации, но и рассеивают падающий свет, так что часть его направляется во второе волокно, ведущее к системе детектирования. Конструкцию, приведенную на рис. 30.1,а, успешно применяют в сенсорах для биохимического определения pH и кислорода [18, 19]. В сенсорах этого типа фаза реагента обычно имеет несколько миллиметров в длину.

Конфигурация, показанная на рис. 30.1б, отличается от рассмотренной выше только тем, что для пропускания света как в фазу реагента, так и из нее используется одно и то же волокно. Эта конфигурация подходит для флуоресцентных сенсоров, поскольку представляющее интерес флуоресцентное излучение легко отличить по длине волны от рассеянного возбуждающего света.

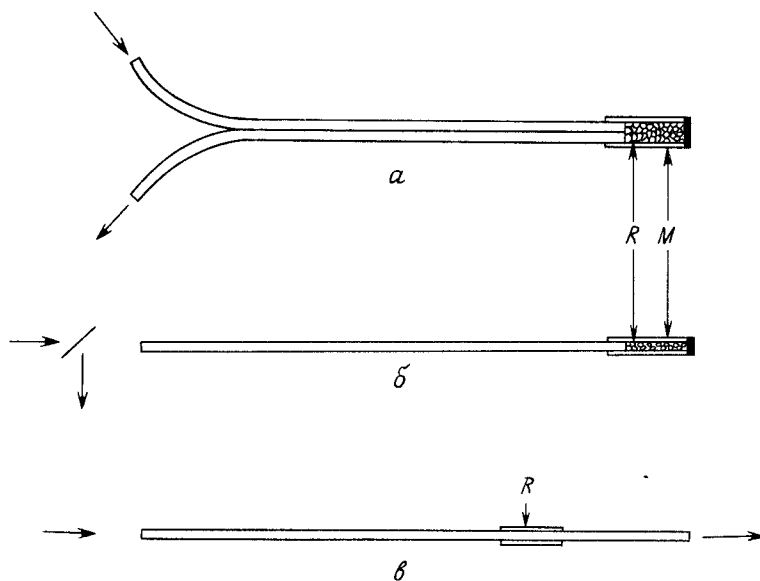


Рис. 30.1. Конфигурации оптических сенсоров; M – мембрана, проницаемая для анализируемого вещества; R – фаза иммобилизованного реагента; стрелки показывают направление прохождения света. *а:* сенсор с разветвлением, в котором свет проходит к иммобилизованному реагенту и от него по отдельным волокнам; *б:* сенсор, в котором свет проходит к реагенту и от него по одному и тому же волокну (или волокнам), а для направления выходящего света к детектору используется расщепитель пучка; *в:* сенсор с нанесенной на внешнюю поверхность волокна фазой реагента.

На рис. 30.1, *в* с части оптического волокна удалено отражающее покрытие и заменено фазой реагента. Преимуществом этой конфигурации является то, что проходящий через оптическое волокно свет проникает в покрытие на небольшое расстояние. Изменения в показателе преломления и поглощающих свойствах фазы реагента будут влиять на интенсивность света, проходящего через волокно. Кроме того, можно возбуждать флуоресценцию реагента на поверхности волокна. Эту конфигурацию используют для иммуноанализа [27, 28], более подробно рассмотренного в гл. 33. Однако для многих приложений эта конфигурация непригодна из-за того, что реагентом покрывают относительно большую по длине часть волокна.

Фаза иммобилизованного реагента в оптическом сенсоре – в общем случае не самая подходящая среда для спектрометрических измерений. Если реагент иммобилизуют на твердых частицах, то падающий свет в значительной степени рассеивается, как показано на рис. 30.1, *а* и *б*. Поскольку фазу иммобилизованного реагента используют непрерывно, влияние оптической неоднородности можно учесть при градуировке. Методика градуировки, однако, будет проще и надежнее, если известно соотношение между оптическим сигналом и определяемой величиной. В случае флуоресцентных сенсоров обычно принимают, что интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна концентрации флуоресцирующего реагента. Хотя во многих случаях это допущение, вероятно, справедливо, следует иметь в виду, что может иметь место внутренняя фильтрация сигнала из-за поглощения возбуждающего излучения иммобилизованным реагентом. Если изменение концентрации флуоресцирующего агента сопровождается изменением в поглощении фазы реагента, то величина эффекта внутреннего фильтра при флуоресценции зависит от концентрации флуоресцирующего вещества, и измеряемая интенсивность больше не пропорциональна концентрации.

Так, используя приведенные в литературе уравнения [35], можно рассчитать, что при большом эффекте внутреннего фильтра отклик флуоресцентного индикатора на pH существенно смещается.

В случае сенсоров, принцип действия которых основан на изменении окраски, вывод теоретического соотношения между концентрацией поглощающего вещества и измеряемой интенсивностью значительно более сложен. Во-первых, не существует способа измерять интенсивность сигнала сравнения при той же длине волны в отсутствие поглощающего вещества. Вместо сигнала сравнения приходится использовать результаты измерений при другой длине волны, при которой падающий свет не поглощается, либо пропускать свет по отдельному оптическому пути, обходящему фазу реагента. Во-вторых, взаимодействие падающего излучения с окрашенным реагентом включает как отражение, так и поглощение. Хотя оптические сенсоры, основанные на изменении окраски, и способны давать отклик, линейно зависящий от концентрации определяемого вещества в относительно узком ее диапазоне [19], вывод количественного соотношения между сигналом и концентрацией все еще остается проблемой. Наряду со спектроскопическими факторами это является еще одной причиной, почему по возможности предпочитают сенсоры, основанные на изменениях флуоресцентного сигнала.

30.4. Выбор реагента

Иммобилизованный реагент в оптическом сенсоре может взаимодействовать с определяемым веществом самыми разными способами, которые и будут рассмотрены в этом разделе.

30.4.1. Индикатор

Реагент может служить индикатором, если он обратимо реагирует с определяемым веществом с образованием продукта, оптические характеристики которого отличаются от свойства несвязанного реагента. Этот подход особенно привлекателен при измерении по возможности равновесного сигнала. В большинстве описанных до настоящего времени оптических сенсоров используются реагенты, действующие именно как индикаторы. Примером может служить pH-сенсор, в котором реагент можно рассматривать как индикатор в основной форме, определяемое вещество – это ионы водорода, а продукт – протонированный индикатор.

Взаимодействие индикатора с определяемым веществом можно представить уравнением



где A – определяемое вещество; R – реагент, AR – соединение с реагентом. Если стехиометрия реакции выражается соотношением 1:1, то константа равновесия равна

$$K_p = AR/[A]R, \quad (30.2)$$

где R и AR – число молей свободного и связанного реагента в иммобилизованной фазе соответственно. Предполагается, что коэффициенты активности R и AR в иммобилизованной фазе одинаковы, и, таким образом, они сокращаются.

Величины AR и R связаны с концентрацией определяемого вещества следующим образом:

$$AR = K_p[A]C_R/(1 + K_p[A]) \quad (30.3)$$

$$R = C_R / (1 + K_p[A]), \quad (30.4)$$

где C_R – общая концентрация свободного и связанного реагента:

$$C_R = AR + R. \quad (30.5)$$

Величина C_R должна быть постоянной, поскольку постоянно число молей реагента в иммобилизованной фазе.

Если измеренный оптический параметр пропорционален AR , то сигнал сенсора пропорционален $[A]$ при низких концентрациях ($[A] \ll 1/K_p$) и постепенно выходит на насыщение, достигая предельного значения при $[A] \gg 1/K_p$.

Если же измеряемый параметр пропорционален R , то по мере добавления определяемого вещества сигнал уменьшается. В этом случае линейный градуировочный график можно получить, преобразовав соответствующим образом уравнение (30.4):

$$C_R/R = 1 + K_p[A]. \quad (30.6)$$

В этом случае измеряют отношение сигналов в присутствии и в отсутствие определяемого вещества. С такой ситуацией обычно приходится сталкиваться при работе с сенсорами, основанными на принципе тушения флуоресценции. При этом K_p является не истинной равновесной константой, а мерой восприимчивости флуоресцирующего реагента к тушению, и зависит от соотношения скоростей тушения и других процессов, связанных с возбужденными состояниями.

Зависимость от количества иммобилизованного индикатора C_R можно было бы устранить, если бы удалось одновременно измерить как AR , так и R , поскольку отношение этих двух величин прямо пропорционально концентрации определяемого вещества:

$$AR/R = K_p[A]. \quad (30.7)$$

Такая ситуация является предпочтительной. Фактически измерение R здесь служит сигналом сравнения для определения AR , причем измеряемое отношение не зависит от приборных флуктуаций и каких-либо изменений оптических свойств реагента.

Поскольку реагент используется как индикатор, сигнал сенсора неизбежно зависит от K_p . Чтобы реагент можно было использовать в оптическом сенсоре, недостаточно только подходящих оптических характеристик, но и значение K_p должно соответствовать диапазону определяемых концентраций (к примеру, диапазон значений рН, измеряемых оптическим сенсором, зависит от pK_a иммобилизованного индикатора). Любая неконтролируемая переменная, которая влияет на K_p , является источником погрешности. Так, поскольку активность заряженных реагентов зависит от ионной силы, колебания последней также могут быть источником погрешности. Кроме непосредственного влияния на K_p могут иметь место и косвенные эффекты. Например, колебания температуры и/или ионной силы могут воздействовать на носитель иммобилизованного реагента (допустим, вызывая его набухание) и тем самым влиять на K_p . Такие проблемы, естественно, желательнее выявить еще до оценки долгосрочных характеристик отклика оптических сенсоров в практических целях.

В проведенном выше анализе предполагалось, что количество анализируемого вещества, связанного с иммобилизованным реагентом, мало по сравнению с общим содержанием этого вещества в пробе. В противном случае из-за изменения концентрации анализируемого вещества могут возникнуть систематические ошибки.

30.4.2. Конкурентное связывание

Концепция сенсора на основе конкурентного связывания впервые была предложена в работе [22]. В сенсорах этого типа фаза иммобилизованного реагента содержит как

селективный реагент, так и связанный с ним «лиганд». Добавление определяемого вещества приводит к вытеснению лиганда из его комплекса с реагентом:



где L – лиганд. Для протекания этой реакции необходимо, чтобы лиганд или реагент находился в растворе. Молекулы компонента, находящегося в растворе, должны быть большими (по сравнению с определяемым веществом), так, чтобы его можно было иммобилизовать, физически удерживая мембраной, селективно проницаемой для определяемого вещества за счет соответствующего выбора размеров пор.

Измеряемый оптический параметр так или иначе связан с взаимодействием лиганд – реагент. Первый описанный в литературе сенсор на основе конкурентного связывания разрабатывали для определения глюкозы. В этом приборе реагент, конканавалин А, иммобилизовали на внутренней поверхности полый трубки, проницаемой для глюкозы [23]. Конец оптического волокна помещали внутри полый трубки, при этом иммобилизованный конканавалин А находился вне оптического пути. В результате меченный флуоресцирующим веществом лиганд (декстран, меченный флуоресцеином) не возбуждается при связывании с конканавалином А. Добавленная глюкоза замещает декстран, позволяя ему диффундировать в область оптического пути, где флуоресцеин возбуждается. Следовательно, увеличение содержания глюкозы сопровождается увеличением наблюдаемого сигнала флуоресценции. Поскольку молекулы декстрана слишком велики, чтобы проникнуть через стенки полый трубки, он остается иммобилизованным.

В лаборатории, где работает автор, в настоящее время разрабатывают сенсоры, в которых конкурентное связывание сочетается с флуоресцентным переносом энергии. В этом случае лиганд содержит метку донора, а реагент – акцептора (или наоборот). Подбирают возбуждающий свет с такой длиной волны, чтобы селективно возбуждался только донор. Если лиганд связан с реагентом, то расстояние между донором и акцептором так мало, что возможен перенос энергии от донора к акцептору. При связывании определяемого вещества с реагентом лиганд вытесняется, и расстояние между донором и акцептором увеличивается настолько, что переноса энергии между ними не происходит. Это приводит к увеличению испускания света донором и уменьшению – акцептором. Измеряемой величиной является отношение интенсивностей флуоресценции донора и акцептора. Для получения сигнала сравнения удобно использовать две различные длины волны.

Помимо глюкозного сенсора [23], конкурентное связывание в принципе можно применять и в случае многих других реакций. Помимо возможности определять вещества, прямое детектирование которых затруднено, этот подход привлекателен тем, что позволяет до некоторой степени контролировать диапазон определяемых концентраций, варьируя концентрацию лиганда.

Основное ограничение метода конкурентного связывания, видимо, заключается в низкой скорости отклика. Прочное связывание лиганда и определяемого вещества с реагентом приводит к тому, что скорость диссоциации мала. Поскольку отклик сенсора определяется диссоциацией комплекса лиганда или определяемого вещества с реагентом, то, очевидно, время отклика должно быть велико.

Практическое применение конкурентного связывания в сенсорных устройствах более детально описано в гл. 32.

30.4.3. Катализатор

Иммобилизованный реагент может катализировать превращение определяемого вещества в продукт с иными оптическими свойствами. Так, описан сенсор на основе иммобилизованной щелочной фосфатазы, катализирующей гидролиз *n*-нитрофенил-

фосфата в *n*-нитрофеноксид [1]. Измеряемый сигнал представляет собой поглощение продукта в стационарном состоянии в условиях, когда скорость образования продукта уравнивается скоростью его диффузии от сенсора. Этот прием в принципе применим и к другим ферментам, что фактически ведет к созданию целого класса новых устройств.

Каталитические сенсоры требуют тщательного контроля условий реакции. Факторы, влияющие как на скорость катализируемой реакции, так и на эффективность массопереноса к поверхности сенсора и от нее, влияют и на величину сигнала в стационарном состоянии. Хотя сам этот подход вполне заслуживает дальнейшего изучения, необходимо еще доказать применимость основанных на нем сенсоров на практике.

30.4.4. Хемилюминесценция

В принципе невозможно разработать сенсорное устройство непрерывного действия, используя фазу реагента, необратимо взаимодействующего с определяемым веществом (если только не позаботиться об удалении продукта реакции и обновлении реагента). Зато такие приборы могли бы действовать как интегрирующие сенсоры, поскольку количество образующегося продукта пропорционально количеству определяемого вещества, с которым сенсор контактировал с момента начала работы. В некоторых случаях продукт можно удалять, помещая фазу иммобилизованного реагента в другую среду [27, 28]. При этом сенсор «перезаряжается» и как интегрирующий прибор может использоваться многократно.

Исключением из рассмотренной выше группы приборов являются сенсоры на основе хемилюминесценции и биолюминесценции. Причина этого состоит в том, что хеми- и биолюминесценция пропорциональны скорости генерации продукта, а не его концентрации. Здесь измеряемым параметром является стационарное излучение света по мере диффузии и взаимодействия определяемого вещества в фазе реагента. Образовавшийся продукт в дальнейшем не вносит вклада в наблюдаемый сигнал. По мере расхода реагента реакция, ответственная за люминесцентное излучение, будет замедляться. Это затруднение, однако, можно свести к минимуму, если общее количество реагента велико по сравнению с расходуемым. В работах автора [3, 12] описан чувствительный кислородный сенсор на основе хемилюминесценции тетра-*к*(алкиламиноэтилена).

Привлекательной особенностью сенсоров на основе хеми- и биолюминесценции является то, что они не требуют источника возбуждения, поскольку свет генерируется в ходе аналитической реакции. Однако, поскольку сигнал измеряют в стационарном состоянии, ему свойственна чувствительность к параметрам, влияющим либо на подачу определяемого вещества к поверхности сенсора, либо на скорость процесса, в котором генерируется свет. Более детально возможности таких сенсоров обсуждаются в гл. 31.

30.4.5. Адсорбент

Фаза реагента может представлять собой своего рода адсорбент, который эффективно концентрирует детектируемое оптически вещество в «поле зрения» оптического волокна. Фактически в таком устройстве объединяется разделение с прямым спектроскопическим детектированием. Основанный на этом принципе сенсор, чувствительный к полиароматическим углеводородам, описан в работе [5]. Тем не менее, хотя прямые определения *in vivo* оптически детектируемых веществ вызвали интерес [26], до сих пор отсутствуют примеры биологических приложений этого подхода.

30.5. Применение оптических сенсоров на практике

30.5.1. Определение рН

Градуировочные кривые для оптических сенсоров в принципе более стабильны, чем для электродов. Поэтому прилагаются значительные усилия по разработке оптического рН-сенсора, пригодного для непрерывных измерений *in vivo*. С этой целью использовали различные индикаторы, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Поглощение фенолового красного меняется в зависимости от рН при длинах волн больше 450 нм, и, таким образом, этот краситель можно использовать с пластиковыми оптическими волокнами [19]. У ковалентно иммобилизованного индикатора значение pK_a составляет 7,6, тогда как в растворе $pK_a = 7,9$. Измеряемым параметром здесь является отношение интенсивности отраженного фазой реагента (или прошедшего через нее) света с длиной волны 558 нм, которой соответствует максимум поглощения основной формы красителя, к интенсивности света с длиной волны 600 нм, при которой не поглощает ни одна форма индикатора. Сенсор позволяет измерять рН с точностью 0,01 ед. рН в диапазоне от 7,0 до 7,4. Он не требует переградуировки в течение нескольких часов. При изменении рН сигнал сенсора меняется экспоненциально и за 0,7 мин достигает уровня $(1 - 1/e)$, или 63% от конечного значения. Недостатком сенсора является то, что он основан на регистрации не флуоресценции, а изменении способности фазы реагента к поглощению или отражению света.

В работах [2, 11] изучен индикатор 4-метилумбеллиферон, привлекательный тем, что его кислая и основная формы флуоресцируют при разных длинах волн и, таким образом, можно связать рН с отношением интенсивностей флуоресценции обеих форм. Однако 4-метилумбеллиферон возбуждается в ультрафиолетовой области спектра (318 нм), поэтому требуется относительно дорогостоящее оборудование, т. е. источник света с дуговой лампой и оптическое волокно из плавленого кварца.

Еще одним индикатором, привлекающим внимание исследователей, является

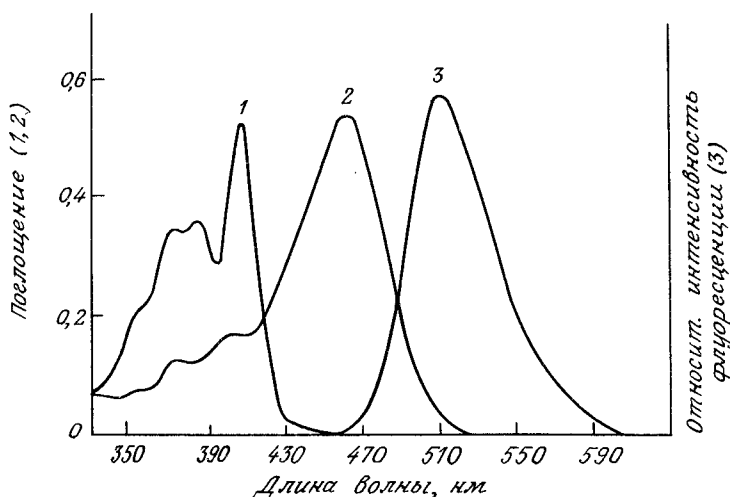


Рис. 30.2. Спектральные свойства ГПТС. 1 — спектр поглощения кислой формы; 2 — спектр поглощения основной формы; 3 — спектр флуоресцентного испускания основной формы. При нейтральных рН наблюдается флуоресценция основной формы, даже если индикатор в основном состоянии находится в кислой форме.

тринатриевая соль 8-гидрокси-1,3,6-пирентрисульфоновой кислоты (ГПТС) – наиболее подходящий растворимый индикатор для измерений в области физиологических значений pH [33]. Спектры различных форм ГПТС приведены на рис. 30.2. Основная форма индикатора избирательно возбуждается при 470 нм, тогда как кислая форма – при 405 нм. В буферном растворе в физиологической области pH кислая форма ГПТС в возбужденном состоянии быстрее депротонируется, чем флуоресцирует. Поэтому наблюдается излучение основной формы индикатора, даже если в основном состоянии индикатор находился в кислой форме. Отношение интенсивностей флуоресценции, возбуждаемой при 405 и 470 нм, измеряют в зависимости от pH. Отношение интенсивностей флуоресценции ГПТС измеряют, как и в случае 4-метилумбеллиферона, но при этом можно использовать стеклянное оптическое волокно и источник света с обычной лампой накаливания.

Поскольку ГПТС содержит три сульфогруппы, значение pK_a в растворе сильно зависит от ионной силы. Разница в значениях pH, измеряемых с 4-метилумбеллифероном и ГПТС, фактически может служить оптическим индикатором ионной силы [15, 16]. ГПТС иммобилизуют как ковалентным связыванием, так и путем ионного обмена [35]. Иммобилизация приводит к изменению и даже к обращению зависимости pK_a от ионной силы. Если иммобилизовать ГПТС на субстрате, обеспечивающем приемлемую зависимость pK_a от ионной силы, то этот индикатор, вероятно, оказался бы наилучшим для измерений в области физиологических значений pH. (Следует отметить, что автор этой главы ранее обращал внимание на независимость от ионной силы значений pH, измеренных с помощью иммобилизованного на ионообменной мембране ГПТС [35]. При этом подразумевается только, что измерение отношения интенсивностей позволяет исключить влияние ионной силы на эффективность флуоресценции, а отнюдь не то, что при иммобилизации ГПТС на мембране pK_a не зависит от ионной силы.)

В качестве флуориметрических pH-индикаторов можно использовать также флуоресцеин и его производные [13, 20]. Достоинством этих индикаторов является то, что они могут эффективно возбуждаться аргоновым ионным лазером.

Рабочий диапазон оптических сенсоров составляет 1–2 единицы pH с центром в точке, соответствующей pK_a индикатора. До сих пор усилия исследователей были направлены в основном на поиск индикаторов, пригодных для измерений в физиологическом диапазоне pH; pH-индикаторам, функционирующим вне этого диапазона, посвящено малое число работ. Ряд иммобилизованных колориметрических индикаторов, изменяющих окраску при самых различных pH, был опробован для использования в сенсорах на основе отражения света [6, 7].

30.5.2. Определение pCO_2

Оптические сенсоры CO_2 аналогичны CO_2 -электроду Северинхауза. Оптический pH-сенсор помещают в резервуар с раствором бикарбоната и закрывают проницаемой для CO_2 мембраной, обычно силиконовой. Парциальное давление CO_2 определяет концентрацию угольной кислоты во внутреннем растворе, которая в свою очередь определяет pH буферной системы угольная кислота/бикарбонат. Диапазон измеряемых парциальных давлений CO_2 зависит от концентрации бикарбоната и чувствительности оптического pH-сенсора. Оптические pH-сенсоры, дающие отклик на физиологические значения pH, вполне пригодны в качестве внутреннего чувствительного элемента для сенсоров, чувствительных к парциальным давлениям CO_2 в диапазоне, представляющем интерес для физиологии. Действительно, pH-сенсоры, широко используемые в физиологических исследованиях, применяют также и в качестве внутреннего чувствительного элемента в сенсорах pCO_2 [9, 10, 32, 36].

Сенсоры CO_2 устроены даже проще, чем pH-сенсоры. Поскольку в сенсорах CO_2 внутренний раствор отделен от анализируемого раствора гидрофобной газопроницаемой мембраной, колебания ионной силы анализируемого раствора не создают проблемы. Кроме того, индикатор можно растворить во внутреннем растворе вместо иммобилизации на твердой подложке. Основной проблемой при разработке оптических сенсоров CO_2 является обеспечение малого времени отклика, так как к собственному времени отклика pH-сенсора добавляется время достижения равновесия во внутреннем растворе. Решение этой проблемы состоит прежде всего в том, чтобы при конструировании сенсора минимизировать расстояние, на которое должен продиффундировать CO_2 , прежде чем в приборе будет достигнуто равновесие.

30.5.3. Определение кислорода

Большинство описанных в литературе оптических кислородных сенсоров основано на тушении флуоресценции. Поскольку измерения проводят в состоянии равновесия, эти устройства менее чувствительны к колебаниям температуры и параметрам потока, чем широко применяемый полярографический кислородный электрод. Флуоресцирующий реагент может находиться в растворе, отделенном от анализируемого раствора гидрофобной проницаемой для кислорода мембраной, либо внедряться в твердую фазу или на ее поверхность. В общем случае восприимчивость реагента к тушению его флуоресценции кислородом зависит как от самого флуорофора, так и от среды. Графики зависимостей I_{f0}/I_f от парциального давления кислорода (где I_{f0} и I_f – интенсивности флуоресценции в отсутствие и в присутствии кислорода соответственно) имеют вид прямых, пересекающихся с осью ординат в точке 1,00 (согласно уравнению (30.6), интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству реагента, флуоресценция которого не тушится). Поскольку эти графики линейны, градуировку можно проводить по одной точке.

В оптических кислородных сенсорах используют множество реагентов. Например, пиренмасляную кислоту применяют как в растворе [9, 10], так и иммобилизованную на твердой подложке [34]. Время флуоресценции пиренбутирата довольно велико, поэтому он достаточно долго может взаимодействовать с кислородом и, следовательно, более восприимчив к тушению, чем большинство других флуорофоров. Однако для возбуждения пиренмасляной кислоты требуется ультрафиолетовое излучение (342 нм). В работе [18] был проведен скрининг 70 красителей, в результате чего в качестве реагента для оптического кислородного сенсора был выбран перилендибутират, адсорбированный на гидрофобном носителе. Этот краситель возбуждается при 468 нм и излучает при 514 нм, так что его можно использовать с пластиковым оптическим волокном. Описан [8] стерилизуемый кислородный сенсор, в котором флуорофор помещен непосредственно в силиконовую мембрану. Время отклика оптического кислородного сенсора может быть меньше 1 с.

Поскольку используемые в оптических кислородных сенсорах фазы реагента отделяются гидрофобной мембраной, они подвержены влиянию только летучих компонентов анализируемого раствора. В частности, некоторые анестетики, например галогенированные углеводороды [18], могут тушить флуоресценцию. При иммобилизации флуорофора на гидрофильном субстрате адсорбированная вода, как оказалось [18], может понижать восприимчивость флуорофора к тушению.

В качестве сигнала сравнения в кислородном сенсоре можно использовать само возбуждающее излучение, измеряемое либо непосредственно, либо в виде света, отраженного (или рассеянного в обратном направлении) от фазы реагента. Альтернативный подход заключается в добавлении стандартного флуорофора, который не восприимчив к тушению кислородом и излучает при другой длине волны.

При определении кислорода по изменению интенсивности, а не по сдвигу в спектре, любое изменение отклика сенсора, связанное с разложением реагента или изменением его восприимчивости, можно выявить только с помощью переградуировки сенсора (этим рассматриваемые кислородные сенсоры отличаются от оптических рН-сенсоров, у которых регистрируется соотношение кислой и основной форм индикатора). Проблему разложения реагента можно решить, измеряя не интенсивность, а время флуоресценции. Отношение времен флуоресценции в отсутствие и в присутствии тушителя эквивалентно I_{f0}/I_f . Такой подход к определению кислорода легче реализовать, если удастся найти флуорофор или люминофор с относительно большим временем флуоресценции, что упрощает требования к приборам для его точного измерения.

Еще один подход, на котором мог бы быть основан кислородный сенсор, состоит в использовании реагента, окраска которого меняется при обратимом связывании кислорода. Например, кислородный сенсор мог бы измерять изменения в спектре поглощения/отражения иммобилизованного гемоглобина. Недостатком такого подхода является то, что реагенты, обратимо связывающие кислород, проявляют тенденцию к медленному необратимому окислению. Следовательно, чтобы осуществить этот подход на практике, необходимо подобрать фазу реагента, достаточно устойчивую к окислению. Привлекательной же особенностью данного подхода является возможность измерять отношение количеств связанного с кислородом и свободного реагента.

30.5.4. Сенсоры, чувствительные к ионам металлов

На основе иммобилизованных лигандов, комплексы которых флуоресцируют, автором и его коллегами [21, 25] разработаны сенсоры, чувствительные к ионам металлов. В общем случае в качестве индикатора в фазе реагента сенсора ионов металлов можно использовать любой лиганд, оптические свойства которого (либо окраска, либо флуоресценция) меняются при комплексообразовании. Точно так же, как рабочий диапазон рН-сенсора зависит от pK_a иммобилизованного кислотнo-основного индикатора, так и диапазон измеряемых с помощью иммобилизованного лиганда концентраций иона зависит от константы комплексообразования. Недостаток, присущий разрабатываемым сенсорам ионов металлов, состоит в том, что комплексообразование нередко сопровождается вытеснением одного или нескольких протонов. В таком случае отклик сенсора зависит от кажущейся константы образования, зависящей в свою очередь от рН. Таким образом, при сенсорном определении ионов металлов требуется контроль рН.

30.5.5. Галогенидные сенсоры

В литературе описано два различных типа оптических сенсоров галогенид-ионов. Один тип основан на галогенидном тушении флуоресценции иммобилизованного органического катиона [29]. Поскольку тяжелые атомы являются лучшими тушителями, чем легкие, чувствительность сенсоров этого типа к галогенид-ионам убывает в ряду $I^- > Br^- > Cl^-$. В другом типе сенсоров в качестве реагента используют флуоресцеинат серебра [4]. При добавлении галогенид-ионов соединение серебра с флуоресцеином разрушается, и последний начинает флуоресцировать. Чувствительность этого сенсора к галогенид-ионам меняется в том же ряду, что и для первого типа сенсоров, но теперь этот ряд чувствительности определяется относительными растворимостями соответствующих галогенидов серебра.

30.5.6. Другие сенсоры

В начале главы упоминались (а в других главах описаны детально) сенсоры, чувствительные к глюкозе и антителам и основанные на конкурентном связывании. В настоящее время конструкции сенсоров для определения pH, CO₂, кислорода и других веществ достигли весьма высокого уровня, и можно ожидать, что их будут сопрягать с другими реагентами биологической природы, с тем чтобы создать сенсоры, чувствительные к новым представляющим аналитический интерес веществам. В частности, в работах [30, 31] оптический кислородный сенсор сопрягали с иммобилизованными оксидазами, в результате чего получились сенсоры, чувствительные к субстратам оксидаз.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arnold M. A. Enzyme-based fiber optic sensor. *Anal. Chem.*, **57**, 565–6 (1985).
2. Chen R. F. Fluorescent pH indicators: Spectral changes of 4-methylumbelliferone. *Anal. Lett.*, **1**, 423–8 (1968).
3. Freeman T. M., Seitz W. R. Oxygen probe based on tetrakis(alkylamino)ethylene chemiluminescence. *Anal. Chem.*, **53**, 98–102 (1981).
4. Hirschfield T., Deaton T., Milanovich F., Klainer S. Feasibility of using fiber optics for monitoring groundwater contaminants. *Opt. Eng.*, **22**, 527–31 (1983).
5. Kawahara F. K., Fiutem R. A., Silvus H. S., Newman F. M., Frazar J. H. Development of a novel method for monitoring oils in water. *Anal. Chim. Acta*, **151**, 315–27 (1983).
6. Kirkbright G. F., Narayanaswamy R., Welti N. A. Studies with immobilised chemical reagents using a flow-cell for the development of chemically sensitive fibre-optic devices. *Analyst*, **109**, 15–7 (1984).
7. Kirkbright G. F. Fibre-optic pH probe based on the use of an immobilised colorimetric indicator. *Analyst*, **109**, 1025–8 (1984).
8. Kroneis H. W., Marsoner H. J. A fluorescence-based steribizable oxygen probe for use in bioreactors. *Sensors and Actuators*, **4**, 587–92 (1983).
9. Luebbbers D. W., Opitz N. The pCO₂/pO₂-optode. New probe for measurement of partial pressure of carbon dioxide or partial pressure of oxygen in fluids and gases. *Z. Naturforsch. C: Biosci.*, **30c**, 532–3 (1975).
10. Luebbbers D. W. Optical fluorescence sensors for continuous measurement of chemical concentration in biological systems. *Sensors and Actuators*, **4**, 641–54 (1983).
11. Luebbbers D. W., Speiser P. P., Bisson H. J. Nanoencapsulated fluorescence indicator molecules measuring pH and pO₂ down to submicroscopical regions on the basis of the optode principle. *Z. Naturforsch.*, **32c**, 133–4 (1977).
12. MacDonald B. F., Seitz W. R. Tetrakis N-dimethylaminoethylene is an extraordinarily sensitive reagent for oxygen. *Anal. Lett.*, **15**(A1), 57–66 (1982).
13. Milanovich F. P., Hirschfield T. B., Wang F. T., Klainer S. M. Clinical measurements using fiber optics and optodes. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Engl.*, **494**, 18–24 (1984).
14. Opitz N., Luebbbers D. W. Simultaneous measurement of blood gases by means of fluorescence indicators. *Pfluegers Arch.*, **362**, R52 (1976).
15. Opitz N. New fluorescence photometrical techniques for simultaneous and continuous measurements of ionic strength and hydrogen ion activities. *Sensors and Actuators*, **4**, 473–9 (1983).
16. Opitz N. A correction method for ionic strength-independent fluorescence photometric pH measurement. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **169**, 907–12 (1984).
17. Peterson J. I., Vurek G. G. Fiber optic sensors for biomedical applications. *Science*, **224**, 123–7 (1984).
18. Peterson J. I., Fitzgerald R. V., Buckhold D. K. A fiber-optic pO₂ sensor for physiological use. *Anal. Chem.*, **56**, 62–7 (1984).
19. Peterson J. I., Goldstein S. R., Fitzgerald R. V., Buckhold D. K. Fiber optic pH probe for physiological use. *Anal. Chem.*, **52**, 864–9 (1980).
20. Saari L. A., Seitz W. R. pH sensor based on immobilized fluoresceinamine. *Anal. Chem.*, **54**, 821–3 (1982).
21. Saari L. A. Immobilized morin as fluorescence sensor for determination of aluminium (III). *Anal. Chem.*, **55**, 667–70 (1983).
22. Schultz J. S., Sims G. Affinity sensors for individual metabolites. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **9**, 65–71 (1979).
23. Schultz J. S., Mansoure S., Goldstein I. J. Affinity sensor: A technique for developing implantable sensors for glucose and other metabolites. *Diabetes Care*, **5D**, 245–53 (1982).
24. Seitz W. R. Chemical sensors based on fiber optics. *Anal. Chem.*, **56**, 16A (1984).
25. Seitz W. R., Saari L. A., Zhujun Z., Pokornicki S., Hudson R. D., Sieber S. C., Ditzler M. A. Metal ion

- sensors based on immobilized fluorogenic ligands. In *Advances in Luminescence Spectrometry* (eds. L. J. Cline Love, D. Eastwood), pp. 63–77. ASTM Pub. no. 863, Philadelphia, 1985.
26. *Sepaniak M. J., Tromberg B. J., Eastham J. F.* Optical fiber fluoroprobes in clinical analysis. *Clin. Chem.*, **29**, 1678–82 (1983).
 27. *Sutherland R. M., Daehne C., Place J. F.* Preliminary results obtained with a no-label homogeneous, optical immunoassay for human immunoglobulin G. *Anal. Lett.*, **17**, 43–53 (1984).
 28. *Sutherland R. M., Ringrose A. S.* Optical detection of antibody–antigen reactions at a glass–liquid interface. *Clin. Chem.*, **30**, 1533–8 (1984).
 29. *Urbano E., Offenbacher H., Wolfbeis O. S.* Optical sensor for continuous determination of halides. *Anal. Chem.*, **56**, 427–9 (1984).
 30. *Uwira N., Opitz N., Luebbers D. W.* Influence of enzyme concentration and thickness of the enzyme layer on the calibration curve of the continuously measuring glucose optode. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **169**, 913–21 (1984).
 31. *Voelkl K. P., Opitz N., Luebbers D. W.* Continuous measurement of concentrations of alcohol using a fluorescence-photometric enzymatic method. *Fres. Z. Anal. Chem.*, **301**, 162–3 (1980).
 32. *Vurek G. G., Feustel P. J., Severinghaus J. W.* A fiber optic pCO₂ sensor. *Annals of Biomed. Eng.*, **11**, 499–510 (1983).
 33. *Wolfbeis O. S., Fuerlinger E., Kroneis H., Marsoner H.* Fluorimetric analysis. I. A study of fluorescent indicators for measuring near neutral ('physiological') pH-values. *Fres. Z. Anal. Chem.*, **314**, 119–24 (1983).
 34. *Wolfbeis O. S., Offenbacher H., Kroneis H., Marsoner H.* A fast responding fluorescence sensor for oxygen. *Mikrochimica Acta*, 153–8 (1984).
 35. *Zhujun Z., Seitz W. R.* A fluorescence sensor for quantifying pH in the range from 6.5 to 8.5. *Anal. Chim. Acta*, **160**, 47–55 (1984).
 36. *Zhujun Z.* A carbon dioxide sensor based on fluorescence. *Anal. Chim. Acta*, **160**, 305–9 (1984).

Глава 31

Перспективы применения био- и хемилюминесценции в биосенсорах

Ф. Мак-Капра

31.1. Введение

Из дискуссий о концепции биосенсоров, особенно в этой коллективной монографии, очевидно, что существует несколько подходов. Наиболее универсальный заключается в использовании материалов биологического происхождения, таких, как целые клетки, ферменты или иммуноглобулины для первичного контакта с определяемым веществом. Возникающие при этом проблемы являются общими для всех биосенсоров, и мы их обсуждать не будем. С другой стороны, методы обработки сигналов хорошо развиты, и часто требуется только миниатюризация или адаптация этих методов для конкретных целей.

В центре проблемы биосенсоров находятся преобразователи, переводящие биохимические процессы в электронные эффекты или электрические сигналы. Преобразователи – широкое поле деятельности для изобретателей и людей с воображением. Наградой им является чувствительность биосенсора и его способность работать в биологических жидкостях без помех.

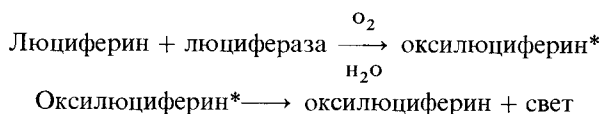
Недавно было показано, что как био-, так и хемилюминесцентные реакции обеспечивают непревзойденную чувствительность, особенно в сочетании с весьма совершенной аппаратурой для счета фотонов. Однако в обычных устройствах их используют сравнительно мало. Целью данной главы является описание принципов люминесцентных методов, демонстрация их конкурентоспособности по сравнению с известными ферментными и иммуноферментными методами, а также выяснение способов использования их особых свойств. Использование люминесценции в биосенсорах еще находится на стадии предварительных исследований, однако по ее применению в анализе имеется обширная литература [10, 23, 24].

31.2. Биолюминесценция

Испускание света в результате реакций органических молекул в растворе является интересным и к настоящему времени достаточно хорошо изученным явлением. Многие слышали о биолюминесцирующих организмах, таких, как светляки или морской черт. Такого рода организмы ответственны, в частности, за фосфоресценцию моря. Однако очень многие организмы, особенно морские, например головоногие, креветки и глубоководные рыбы, демонстрируют даже более яркие эффекты. Те из биохимических реакций, которые известны, весьма интересны, но на практике почти не используются. Современное состояние различных аспектов биолюминесценции, особенно биологических, рассмотрено в превосходном обзоре [19].

Для генерации света в природе используются различные биохимические процессы. Простейшим из них, в смысле компонентов, является биолюминесценция у небольших рачков *Cypridina hilgendorffii*. [52]. Механизм биолюминесценции этих организмов достаточно хорошо изучен и служит основой для описания испускания света и другими

люминесцирующими организмами:



В простейших случаях люциферин представляет собой небольшую гетероциклическую органическую молекулу, которая при ферментативном окислении превращается в оксильюциферин, находящийся в возбужденном синглетном состоянии. Испускание света в этом состоянии идентично флуоресценции, возникающей при возбуждении оксильюциферина обычным образом.

Некоторые ферменты (люцифераза), участвующие в этой реакции, используют обычные кофакторы, часто играющие центральную роль в метаболических процессах. Поэтому реакции, сопровождаемые испусканием света, могут быть сопряжены с многими биологически важными реакциями. Биолуминесцентная реакция этого типа обнаружена у светляка (кофактор АТФ), морского пера *Renilla* (кофактор PAPS), светящихся бактерий (кофакторы FMN и NADH или NAD(P)H) и медузы *Aequorea* (кофактор Ca^{2+}). В качестве потенциальных компонентов аналитических приборов рассматривались и менее изученные организмы, такие как редко встречающийся моллюск-камнеточек *Pholas dactylus* и червь *Diplocardia*. В серии "Methods in Enzymology" имеется хороший обзор [10] всех типов биолуминесцентных реакций. В настоящее время подготавливается следующий том этой серии.

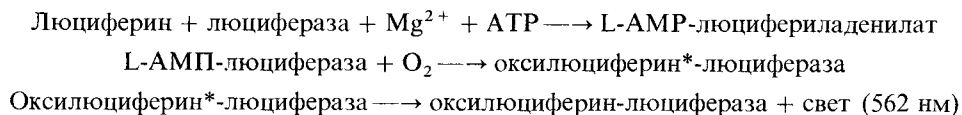
Вряд ли уместно детально обсуждать в этой книге химию и биохимию биолуминесценции, но было бы полезно рассмотреть две наиболее широко используемые системы, поскольку понимание общих принципов лежит в основе любых возможных приложений.

31.2.1. Биолуминесценция светляка

Светляк наиболее хорошо изучен из светящихся организмов. Его химия, биохимия и биология подробно рассмотрены в ряде обзоров [10, 19, 30, 31]. Это был первый организм, с помощью которого продемонстрировали возможности детектирования света в анализе [50].

Хотя люциферин нетрудно синтезировать, люциферазу можно получить только из светляка. Некоторые другие родственные виды из отряда *Coleoptera* имеют такую же световую систему, однако эти организмы относительно редко встречаются и не используются на практике. Методы синтеза люциферина, его экстракции и очистки описаны в работах [10, 27]. Люцифераза относительно устойчива, и ее легко получить с различной степенью чистоты. Для достижения максимальной чувствительности из системы необходимо удалить потенциальные ингибиторы фермента, такие как дегидролюциферин (обнаруживается как примесь в коммерческих препаратах) или пирофосфат, и продукты ферментативной реакции – оксильюциферин и аденозинмонофосфат [27].

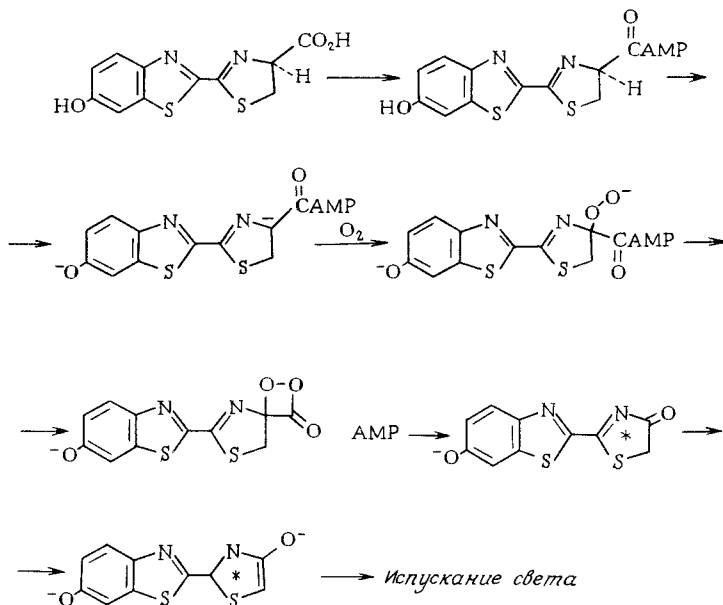
Люцифераза катализирует все реакции, приведенные ниже:



Для облегчения понимания все химические процессы показаны порознь. На самом деле эти реакции могут осуществляться и в отсутствие фермента, при этом эффективность

реакции по сравнению с ферментативной снижается примерно на 25% [33, 57]. В такой хемиллюминесцентной реакции не требуется АТФ, и, таким образом, она не имеет прямого отношения к обсуждаемой здесь проблеме. В принципе она аналогична хемиллюминесцентным системам, которые будут рассмотрены ниже.

Общая эффективность этого процесса, оцениваемая квантовым выходом (см. ниже), исключительно высока и составляет 88% [48].



31.2.2. Использование люциферазы светляка для определения АТФ

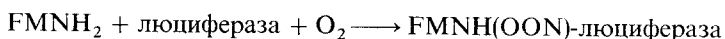
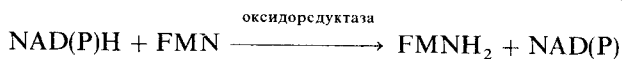
Поскольку АТФ занимает центральное место в биохимии всех живых систем, неудивительно, что имеется большое число работ (более 1000 статей), посвященных его использованию. Описывать все эти приложения не имеет смысла, тем более, что в работах [10, 24] обобщен накопленный в данной области обширный материал и рассмотрены различные методы с применением АТФ. К последним относятся методы определения биомассы, обнаружения бактериальных инфекций (не специфических к различным веществам), определение антибиотиков и любые ферментативные реакции, в ходе которых образуется или потребляется АТФ.

Хотя требуемые для таких анализов материалы можно получать специально [10], очень удобно использовать для этой цели высококачественные коммерческие реактивы (например, фирм Sigma, США, или LKB-Wallac, Турку, Финляндия).

Хотя АТФ и является специфической мишенью, исторически важный метод определения АТФ с помощью люциферазы не пригоден для биосенсорных приложений из-за его сложности. С помощью описываемых ниже гораздо более гибких хемиллюминесцентных систем гораздо легче достичь высокой чувствительности. Тем не менее довольно успешно используют люциферазу, иммобилизованную совместно с другими аналитически важными ферментами [11]. Этот метод позволяет определять на уровне 1 фмоль клинически важный (при заболеваниях сердца) фермент креатинкиназу. Если же еще добавить автоматизированные проточные системы, то можно получить довольно практичные сенсорные устройства [25, 59].

31.2.3. Люминесценция бактерий

Светящиеся бактерии (например, *Photobacterium phosphoreum*, *Vibrio harveyi*) найдены почти во всех морских средах как сапрофиты, свободноживущие организмы и симбионты. Многие рыбы используют свет колоний таких бактерий при спаривании, собирании в косяки и в качестве охотничьей приманки. Светящиеся бактерии легко культивируются, и об их биохимии известно довольно много [16, 17]. Весьма привлекательно и то, что из них можно получать большое количество легко очищаемой люциферазы (до 5% от массы клеток). В бактериях не содержится люциферин, по крайней мере в том смысле, как в случае светляка. По-видимому, испускание света происходит за счет комплекса люциферазы, восстановленного флавина (FMN) и длинноцепочечного насыщенного альдегида. Хотя химизм испускания света бактериями еще не установлен полностью, в общих чертах принята следующая схема:



Коммерческие препараты бактериальной люциферазы обязательно содержат необходимую NAD(P)H·FMN-оксидоредуктазу в том или ином количестве, но примеси других ферментов сильно ограничивают возможности ее использования. Оба фермента нетрудно выделить из растертых в пасту культивируемых клеток в достаточно чистом для аналитических целей виде [18, 20].

31.2.4. Применение бактериальной люминесценции

Мы уже упоминали об использовании биолуминесценции светляка для определения АТФ. Данный метод, несомненно, является наилучшим для определения этого часто встречающегося вещества, причем люциферазу удалось иммобилизовать. Однако легче иммобилизовать другой фермент, притом весьма доступный – бактериальную люциферазу. Ее можно использовать в большом числе методов ферментативного анализа, связанного либо с производством, либо с потреблением NADH или NAD(P)H. Методы определения многих веществ перечислены в работе [21]. Приведем несколько примеров (в скобках даны пределы обнаружения): NADH (0,1 фмоль), глюкоза (0,5–6 пмоль), малат (20–250 пмоль), тестостерон (0,2–5 пмоль), TNT (30 фмоль). Определение TNT, к примеру, проводят в присутствии TNT-редуктазы, использующей NADH как кофактор. Этот метод, очевидно, можно распространить и на другие восстанавливающиеся соединения, для которых имеется соответствующий фермент.

Подробное описание методов иммобилизации редуктазы и люциферазы можно найти в работе [20]. Стеклообразные палочки, используя диоксидазный клей, покрывают слоем шариков органического стекла, содержащего ариламин. Фермент связывают с шариками при помощи диазотирования.

Такую палочку можно использовать более 100 раз без потери активности, хотя активность самих ферментов может уменьшаться почти в тысячу раз. Детектирование света проводят, помещая палочку в буферный раствор, содержащий определенное вещество, перед фотоэлементом. Поскольку палочка захватывает большое количество субстрата (особенно NADH при высоких концентрациях), после каждого анализа ее

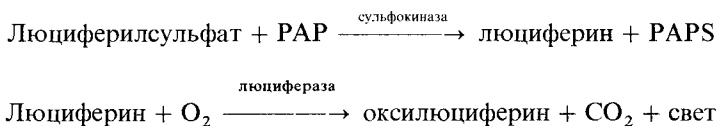
необходимо тщательно промывать, что может приводить к еще большему снижению активности.

Эта система непрерывно совершенствуется. Так, найдено, что эффективными носителями могут служить Сефароза, активированная цианогенбромидом [11], и нейлон-6 [43]. В данной системе иммобилизовано около 25 различных ферментов, причем практически без потери активности как самого фермента, так и испускающих свет компонентов. Используя проточную систему, можно определять NAD(P)H на уровне 6 фмоль.

31.2.5. Другие биолюминесцентные системы

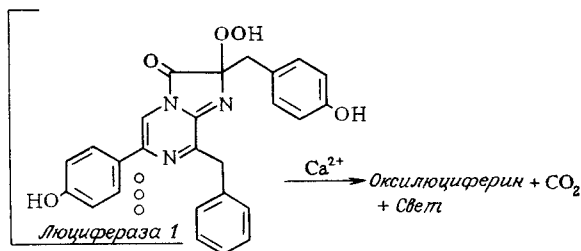
Из множества люминесцирующих организмов, кроме светляка, более или менее используют только медузу *Aequorea*, гидриды *Obelia* и морское перо *Renilla*.

В организме *Renilla* люциферин накапливается в виде енольного сульфата [8] и высвобождается при помощи сульфокиназы. Приведенная ниже последовательность реакций показывает, каким образом 3',5'-фосфоаденозинфосфат (PAP) и продукт реакции 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат (PAPS) можно сопрячь с испусканием света и определять на уровне 10–100 пмоль:



В настоящее время практическое значение этих метаболитов невелико, и данный пример скорее иллюстрирует значение для анализа продолжающихся исследований биолюминесценции.

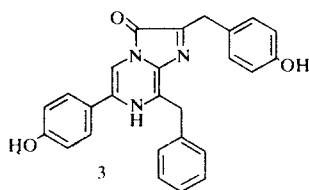
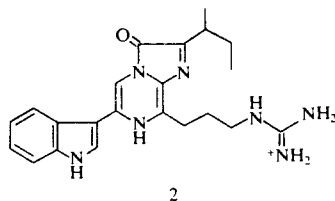
Весьма привлекательным объектом для количественного анализа является Ca^{2+} , играющий центральную роль в процессах внутри клетки [2]. Современные устройства для улучшения четкости изображений [40, 41] с разрешением около 2 мкм позволяют даже локализовать источник Ca^{2+} внутри больших клеток. Рассматриваемый метод определения Ca^{2+} основан на том, что некоторые кишечнополостные (в частности, *Aequorea* и *Obelia*) накапливают люциферин в виде пероксида (1), связанного с люциферазой, в результате чего образуется единая частица, называемая фотопротеином. Последний выделяют в присутствии большого количества ЭДТА, инактивирующего эндогенные ионы кальция. С помощью микроинъекций фотопротеина экорина можно определять Ca^{2+} в цитоплазме на уровне 10^{-7} М.



Концентрация Ca^{2+} в сыворотке слишком велика для прямого определения этим методом. И поскольку методика довольно сложна для практического осуществления, она служит скорее для демонстрации возможностей биолюминесцентных методов, чем

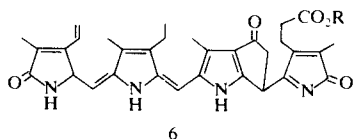
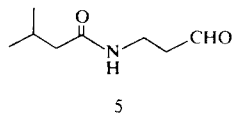
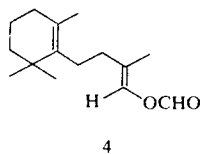
для конструирования реального биосенсора. Тем не менее можно предположить, что химикам в конце концов удастся имитировать триггерную реакцию, обеспечивающую легко детектируемый световой сигнал. С этой целью, учитывая ее научную и практическую важность, можно было бы обследовать множество синтетических соединений, у которых испускание света катализируется определенным ионом или лигандом.

Рачок *Cipridina hilgendorffii* генерирует свет по тому же механизму, что и светляк, несмотря на весьма отличающуюся структуру люциферина (2). Родственный последнему люциферин (3) был сначала выделен из морского пера *Renilla reniformis*, а затем найден в самых разнообразных организмах, включая рыб, мелких креветок, головоногих и очень многих кишечнополостных (например, медузу *Aequorea aequorea*) [9].



Химизм люминесценции, предложенный для этих люциферинов, тесно связан с механизмом люминесценции нескольких эффективных чисто химических систем; эта интерпретация представляет собой заметный успех органической химии [30].

Для ряда люциферинов, в частности выделенных из пресноводного моллюска *Latia neritoides* (4), земляного червя *Diplocardia longa* (5) и жгутикового *Pyrocystis lunula* (6), механизм люминесценции не известен.



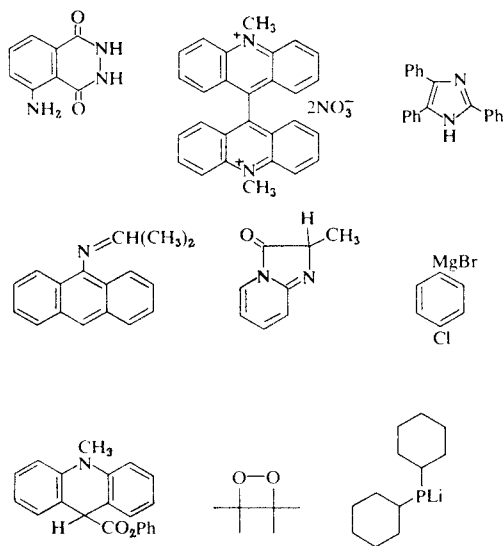
Люцифераза, выделенная из земляного червя *Diplocardia longa*, представляет собой медьсодержащий белок и обладает пероксидазной активностью. Это представляет ценность для определения H_2O_2 и некоторых оксидаз [36]. Как будет показано ниже, пероксидазные реакции могут служить основой прекрасных хемилюминесцентных

методов анализа. Еще одна намного более активная, но крайне дефицитная пероксидазная система выделена из моллюска-камнеточца *Pholas dactylus* [35].

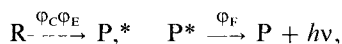
31.3. Хемилюминесценция

Хотя фундаментальные механизмы, лежащие в основе испускания света при протекании биологических и химических реакций, должны быть одними и теми же. Эти две области развивались независимо примерно до середины 60-х гг. Из биологических систем детальный механизм люминесценции обоснован только в случае светляка *Cypridina* и кишечнополостных, тогда как механизмы хемилюминесценции хорошо изучены для большого числа органических соединений.

Хемилюминесценция в растворе практически всегда связана с окислительной реакцией, в которой, как правило, участвует молекулярный кислород и пероксид водорода. Способность к хемилюминесценции можно обнаружить у широкого ряда соединений, и приведенные ниже структуры некоторых хемилюминесцирующих веществ иллюстрируют это разнообразие.



Эффективность испускания света, выраженную как число фотонов, производимых на одну реагирующую молекулу, называют квантовым выходом Φ . В общем случае квантовый выход хемилюминесценции Φ_{CL} зависит от трех факторов — химического выхода Φ_C , квантового выхода флуоресценции Φ_F и доли молекул, переходящих в возбужденное состояние Φ_E .



$$\Phi_{CL} = \Phi_C \times \Phi_F \times \Phi_E$$

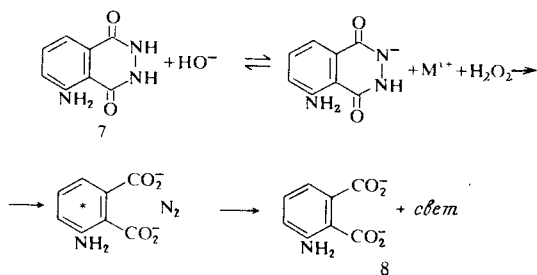
Очевидно, что для достижения максимального значения Φ_{CL} химический выход Φ_C возбужденного продукта P^* должен быть высоким, а выход флуоресценции Φ_F — как можно ближе к единице. Третий фактор Φ_E существенно зависит от механизма реакции. Биолюминесцентная система светляка *in vitro* является наиболее эффективной из всех известных люминесцентных систем и характеризуется квантовым выходом $\Phi_{CL} = 0,88$

[48], однако и простая химическая реакция производного люциферина светляка имеет довольно высокий квантовый выход, равный 0,33 [57]. Для других систем квантовые выходы находятся в диапазоне от $1 \cdot 10^{-8}$ (для реагентов Гриньяра) до 0,25 (для реакции активных оксалатов с подходящими флуорофорами [39]).

Для проведения хемилюминесцентных реакций можно использовать разнообразные растворители, причем водные растворы наименее пригодны для обеспечения высоких квантовых выходов. Исключениями являются реакции циклических гидразидов, таких, как люминол, соли акридиния и до определенной степени некоторые сложные эфиры щавелевой кислоты.

Образующиеся в химической реакции возбужденные молекулы легче всего детектировать, если они находятся в синглетном состоянии. Это связано с тем, что альтернативное триплетное состояние является существенно более долгоживущим, и его излучение подвергается тушению другими присутствующими в системе молекулами, особенно кислородом. Таким образом, наблюдаемое при этом испускание света есть возникшая в результате химической реакции флуоресценция.

Наиболее известное хемилюминесцирующее соединение – это, безусловно, люминол (7). О свойствах люминола и различных его аналогов известно довольно много [14, 44], хотя до сих пор нет общепринятого мнения о механизме светоизлучающей стадии испускания света молекулами этого, столь подробно изученного соединения. Этот факт, однако, не сдерживает широкого применения люминола на практике. Эффективность люминесценции люминола относительно невелика по сравнению с другими гидразинами, отчасти потому, что возбужденный продукт, дифталат-ион (8), флуоресцирует слабо. В лучшем случае квантовый выход хемилюминесценции составляет всего около 1%.



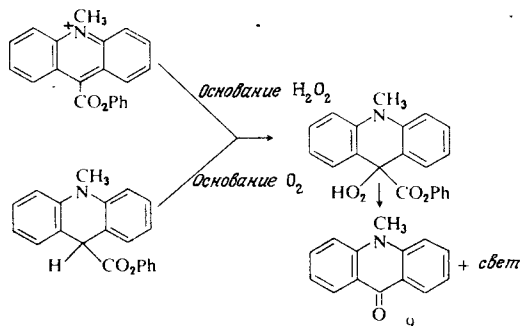
Как уже отмечалось, механизм излучения света люминолом изучен недостаточно. Это особенно относится к каталитической реакции, нашедшей наибольшее применение в анализе. В этом случае приходится удовлетворяться лишь схемой реакции.

В водном растворе для обеспечения сильного испускания света люминолом необходимы как катализатор, так и пероксид водорода, тогда как в дипольных апротонных растворителях типа диметилсульфоксида достаточно присутствия основания и кислорода.

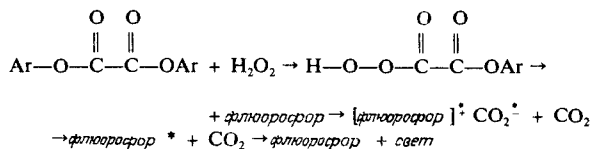
31.3.1. Механизмы хемилюминесценции

В данной главе потребуется только очень краткий очерк механизмов хемилюминесценции, хотя это интересный и важный вопрос, понимание которого наверняка способствовало бы лучшему применению данного явления. Рассмотрение наиболее хорошо изученных хемилюминесцентных реакций даст понимание основ данной области, даже если при этом возникнет множество вопросов. При хемилюминесценции различные соединения, обычно в виде карбаниона или богатых электронами частиц,

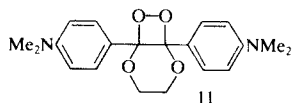
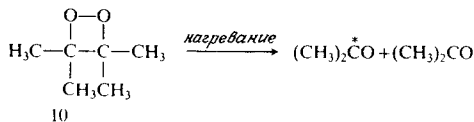
реагируют с кислородом с образованием пероксида. Почти такой же пероксид получается, если соединение подвергается атаке пероксидом водорода, который в водном растворе является очень сильным нуклеофилом. Металлический катализатор в люминольной реакции служит для образования интермедиата – производного люминола, которое затем реагирует с H_2O_2 или продуктом его окисления супероксид-ионом O_2^- . В качестве примера для демонстрации обоих путей можно взять соли акридиния и акриданы.



В этом случае флуоресцирующий продукт **9** непосредственно получается из исходного соединения. Ряд очень активных оксалатов самой разнообразной структуры дает промежуточные соединения, которые сами по себе не флуоресцируют, однако могут реагировать с множеством флуорофоров, причем с очень высоким квантовым выходом. Между прочим, эта реакция иллюстрирует предполагаемый механизм собственно стадии испускания света, включающий перенос электрона [29, 47]. Ароматическая группа Ag флуоресцирующего оксалата должна быть сильно электроотрицательна. Как правило, это динитрофенил или трихлорофенил, хотя возможны и другие варианты. Некоторые такие соединения особенно эффективны в водных растворах [51].



Наконец, следует упомянуть диоксаэтаны **10** и **11**, которые при умеренном нагревании дают свет без участия каких-либо других реагентов или промежуточных продуктов [58]. Простые диоксаэтаны, например **10**, дают почти исключительно триплетные состояния, тогда как более сложные соединения типа **11** дают высокий выход синглетных состояний.

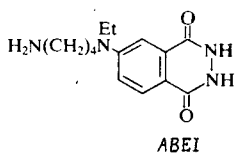


31.3.2. Хемилюминесцентный иммуноанализ

Преимущество использования биолюминесцентных систем в биоанализе заключается в свойственной им высокой специфичности, поскольку люциферазы и родственные им ферменты специфичны по своей природе. Если, однако, в антитело или антиген (а иногда и в то и в другое) ввести хемилюминесцирующую метку, то объединяются все достоинства ферментного и радиоиммуноанализа без каких-либо нежелательных побочных эффектов. При этом чувствительность может быть выше, чем в радиоиммуноанализе [56], метка исключительно устойчива, измерения проводятся достаточно гибко и легко, используется несложное и относительно недорогое оборудование [23, 24].

31.3.2.1. Методики хемилюминесцентного иммуноанализа. Хотя хемилюминесцентный иммуноанализ возник совсем недавно, к настоящему времени разработано несколько типов таких методов. Простейший из них заключается в непосредственном вытеснении ^{125}I люминесцирующим соединением. Описано много вариантов этого метода, в которых для мечения гаптен или небольших пептидов используют циклические гидразиды, например изолюминол [46], сам люминол [28], акридиневые эфиры [55], диоксаэтаны [60].

Методы введения метки весьма сходны с методами присоединения флуоресцирующих соединений к белкам или тирозина (для последующего иодирования) к гаптенам. Во всех случаях используют изотиоцианат, N-гидроксисукцинимидовый эфир и амидоэфиры. Наиболее удобной меткой, впервые примененной в работе [46] в 1978 г., является 6-[N-(4-аминобутил)-N-этил]амино-2,3-дигидро-1,4-фталазин-1,4-дион (АВЕI). Это соединение и другие гидразиды использовали для мечения тироксина. Аналогично были разработаны различные методы анализа стероидов [22, 45]. В этих методах при введении реагентов возникает легко измеряемая, хотя и короткая, вспышка света. Отличные результаты достигнуты в количественном определении белковых и пептидных гормонов, таких как hCG (гонадотропин человека) [22], TSH (тиротропин) [56] и α -фетопrotein [55]. Для этих целей лучше других пригодны соли акридиния.



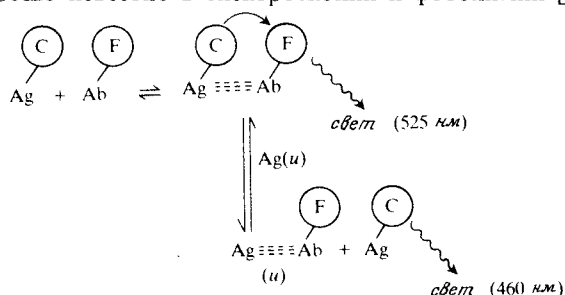
Как уже отмечалось, реакции, в которых излучается детектируемый свет, обычно протекают быстро. Это обеспечивает повышение чувствительности, но, с другой стороны, при введении фермента в качестве метки в антиген или антитела время излучения может существенно увеличиваться и в принципе это можно было бы использовать для непрерывного мониторинга. Из систем такого типа наиболее хорошо изучена пероксидаза в сочетании с люминолом. К примеру, пероксидазу хрена сопрягают со всеми компонентами, необходимыми для полного анализа функции цитовидной железы, включая как белки, так и гаптены. Несмотря на определенные успехи, такие методы еще находятся в стадии становления и можно ожидать их дальнейшего усовершенствования (как было показано на примере улучшения чувствительности при синергизме [60]). Ситуация здесь сходна с тем, как развивался широко известный сейчас иммуоферментный анализ, но обсуждаемый метод имеет еще два очень важных для биосенсоров преимущества. Во-первых, световой поток прямо пропорционален концентрации определяемого вещества (нет нарастания интенсивности сигнала, как в фотометрическом анализе), во-вторых, детектирование существенно проще.

31.3.2.2. Гомогенный анализ. Все описанные выше методы анализа предполагают отдельные измерения. Для непрерывного мониторинга биологически важных соединений с помощью биосенсоров необходимо, чтобы сигнал был непрерывным и непосредственно зависел от изменяющейся концентрации анализируемого вещества, не требуя предварительного разделения пробы. Недавно на основе двух совершенно различных явлений были разработаны гомогенные методы иммуноанализа.

Существенным требованием в этих методах является, конечно, отличие связанного лиганда от свободного, а влияние белка на свойства лиганда — это именно то свойство, которым обладает люминесценция в отличие от радиоактивности. При биолюминесценции свечение люциферина (длина волны и интенсивность) как *in vivo*, так и *in vitro* сильно зависит от связывания люциферина с белками или влияния растворителя в неводной среде [13, 32, 34, 53].

Эти эффекты используют в модельной биотин-авидиновой системе, в которой при связывании интенсивность света, излучаемого люминольной меткой, возрастает в 10 раз. В нескольких методах гомогенного анализа стероидов используют дополнительное усиление света изолуминольной метки при связывании стероида с антителом [22, 45].

Более фундаментальное исследование продемонстрировало недавно возможности еще одного важного метода [5, 38], в котором используется перенос исходного электронного возбуждения хемилуминофора к акцептору энергии флуоресценции. Такое явление хорошо известно в спектроскопии и фотохимии [26].



Лиганд (например, сАМР или прогестерон) ковалентно связывают с хемилуминесцирующим соединением (АВЕ1), а антитело делают флуоресцирующим, присоединя к нему флуоресцеин. Перенос энергии определяется уравнением Ферстера, которое предполагает сближение донора и акцептора на близкое расстояние (около 50 Å) [26]. Таким образом, связанный изолуминол излучает зеленый свет, а свободный сохраняет характерное для него голубое свечение. В данной системе можно использовать различные фильтры (полосы излучения достаточно широки), но лучшие результаты получаются при соотношении 460/525 нм. Принцип данного метода заключается в следующем. Антиген (Ag) метят хемилуминесцирующим соединением (С), а антитело (Ab) — флуоресцентным акцептором (F). При вытеснении Ag—С определяемым веществом (в данном случае антигеном Ag (u)) неизвестной концентрации расстояние между С и F становится слишком большим для переноса энергии, так что связанный и свободный антиген легко различимы.

31.3.3. Методика измерения света

Хемилуминесцентные реакции могут разными способами реагировать на такие факторы, как рН или наличие катализатора. Некоторые хемилуминесцентные системы дают вспышку длительностью в миллисекунды либо более слабое излучение, длящееся несколько часов. Биолюминесцентными реакциями управлять труднее, но и в этом

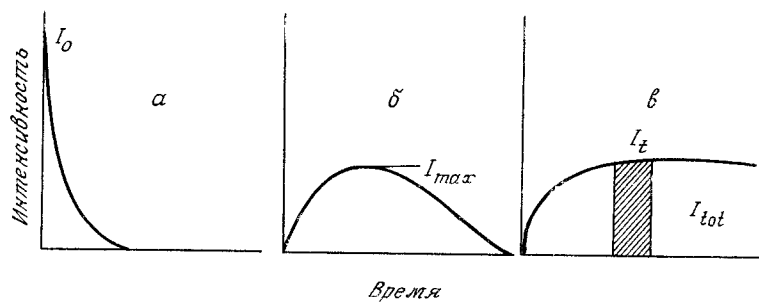


Рис. 31.1. а: Измерение начальной интенсивности сигнала I_0 обеспечивает максимальную чувствительность, но дает меньшую, хотя и приемлемую воспроизводимость.
 б: Приборы, регистрирующие интенсивность пика сигнала, обеспечивают автоматическое количественное измерение. Пикового значения сигнала I_{max} можно достигать, варьируя параметры реакции так, чтобы оптимальная чувствительность сочеталась с воспроизводимостью.
 в: Приборы, аналогичные используемым в (б), могут интегрировать сигнал начиная с любого момента и в течение заданного промежутка времени. С другой стороны, световой сигнал можно интегрировать так долго, как необходимо, чтобы обеспечивалась требуемая чувствительность.

случае достижимы аналогичные характеристики. Таким образом, процесс детектирования может быть организован так, чтобы обеспечить максимум чувствительности или удобства. При заданном числе фотонов чувствительность, очевидно, максимальна, если свет излучается в возможно кратчайшее время. Это имеет свои недостатки, поскольку погрешности, связанные со смешиванием, становятся наибольшими на начальных стадиях процесса люминесценции. Оборот фермента (как, например, в пероксидазных реакциях) приводит к усилению хемилюминесценции, что выражается в длительности и относительно более высокой интенсивности излучения, поскольку люминесцирующее соединение имеется в избытке и связано стехиометрическим соотношением с определяемым веществом. При детектировании возможны также регистрация пиковой интенсивности сигнала, его интегрирование и непрерывный контроль измерения скорости реакции. Схематически эти возможности показаны на рис. 31.1.

31.3.4. Кинетические измерения

Скорости всех люминесцентных реакций сильно зависят от различных факторов. Это потенциально мощное средство анализа, поскольку высокая чувствительность измерительной аппаратуры к свету позволяет анализировать малые порции раствора, быстро отбираемые в ходе протекания реакции.

31.3.5. Светоизмерительные приборы

Наиболее чувствительным и распространенным детектором света является фотоумножитель. Связанная с ним электронная аппаратура достаточно хорошо разработана, и в литературе [1] описаны основные светочувствительные системы, которые нетрудно собрать. Современные счетчики фотонов (импульсов) имеют повышенную чувствительность за счет снижения уровня шумов и все шире используются в серийно выпускаемых люминометрах. Вакуумные фотоумножители почти не создают шума в голубой области спектра (340–450 нм) и являются, таким образом, вполне подходящими, если не идеальными, детекторами для подавляющего большинства хемилюминесцентных реакций. Исключением является разве что система светляка, у которой пик излучения приходится на более длинноволновую область (560 нм). Очень прочные,

дешевые и легко адаптируемые фотодиоды менее чувствительны, чем вакуумные фотоумножители, особенно в голубой области спектра. Можно также использовать современную фотопленку с повышенной чувствительностью. Достоинства каждого из этих подходов обсуждаются в работе [6]. В благоприятных случаях, когда свет достаточно интенсивен, можно использовать недорогие портативные приборы на основе фотодиодных систем. К таким приборам относится множество серийных АТР-детекторов для определения бактериальных инфекций в полевых условиях. Такие и около тридцати других выпускаемых промышленностью люминометров описаны в работе [49]. В лаборатории автора создан образец портативного фотодиодного анализатора глюкозы.

Измерение интенсивности света при анализе с переносом энергии в гомогенных условиях обеспечивает определенные преимущества. Например, измерение отношения интенсивностей света при разных длинах волн само по себе позволяет повысить точность за счет автоматической компенсации колебаний сигнала. С этой целью можно использовать два отдельных вакуумных фотоумножителя с соответствующими фильтрами [5, 37]. Более изящная детектирующая система потенциально с меньшим шумом может быть создана на основе одного фотоумножителя с вращающимися фильтрами и синхродетекторного усилителя [42].

31.4. Возможные применения биосенсоров

Если определить биосенсоры как идеальные приборы, пригодные для имплантации, позволяющие проводить непрерывное наблюдение, уникально чувствительные и свободные от помех, то люминесцентные методы еще должны развиваться и развиваться. Совершенно ясно, однако, что как методы трансляции малых концентраций биологических соединений в легко обрабатываемый сигнал, они заслуживают внимания.

Потенциальные возможности этих методов велики, особенно если учесть, что они обладают достаточной чувствительностью и не требуют предварительного разделения пробы. Существующее аппаратное оформление этих методов в целом является традиционным в том смысле, что подготовленный образец помещают в ячейку или кювету, которую при детектировании излучаемого света ставят перед вакуумным фотоумножителем. Недавние разработки в этой области позволяют предполагать, что в недалеком будущем будет налажен серийный выпуск новых, более удобных приборов.

Моделью для многих приборов на основе описанных в этой главе реакций может служить рассматриваемое ниже устройство, в котором используется оптическое волокно диаметром $\sim 3,3$ мм [12] (см. также гл. 30). В этом приборе, измеряющем концентрацию пероксида водорода в буферном растворе, пероксидазу иммобилизуют в прозрачном полиакриламидном геле и вводят люминол как в гель, так и в раствор. С помощью фотоумножителя, помещенного на другом конце волокна длиной 61 см, можно детектировать концентрации до 10^{-6} М. Указывается, что в отличие от других ферментных электродов нет необходимости в том, чтобы продукт ферментативной реакции диффундировал к поверхности электрода. Таким образом, время отклика прибора очень мало — около 4 с. При этом, однако, возникает проблема, связанная с тем, что сигнал лимитируется массопереносом. Использование световода простой формы позволяет сделать конструкцию приборов удобной и работоспособной [4]. Так что эта идея заслуживает внимания. При реализации такого подхода основные проблемы, вероятно, связаны с иммобилизацией фермента. В случае иммуносенсоров, конечно, возникают трудности, обуславливаемые крайне низкой скоростью установления равновесия при связывании лиганда с антителом. Тем не менее благодаря высокой чувствительности детектирования света и независимости от процессов на электроде дальнейшие исследования в этой области представляются перспективными.

Развитию аналитических приборов на основе биолюминесценции препятствует трудность получения люциферазы. Однако последние обнадеживающие успехи в этой области, в частности клонирование бактериальной люциферазы [3] и фотопротейина экорина [7], позволяют надеяться, что такой проблемы больше не существует. Теперь можно полагать, что редкость данного организма не будет в дальнейшем сдерживать попытки разработки на его основе новых аналитических методов.

Как и в случае любых приборов, основанных на использовании ферментов, возникает вопрос об устойчивости. Уже накоплен довольно большой опыт по использованию люцифераз, иммобилизованных на различных подложках. Препараты люциферазы светляка пока еще недостаточно устойчивы для применения в биосенсорах, однако устойчивость бактериальной люциферазы постоянно улучшается по мере появления лучших методов иммобилизации. Теперь бактериальную люциферазу можно использовать в нескольких сотнях циклов, полагая при этом, что фермент не изменился по сравнению с исходным. Сможет ли на практике этот фермент служить так долго, как немногие известные «долгожители», остается предметом дальнейшего исследования.

Еще одна проблема, возникающая при использовании хемилюминесценции и биолюминесценции в сенсорах, связана с необходимостью пополнения реагента. Коль скоро мы хотим использовать такие преимущества эмиссии света, как простота детектирования и высокая чувствительность, то в конструкции прибора необходимо предусмотреть и возможность добавления реагента. Следует понимать, что рассматриваемое явление предполагает необратимое окисление субстрата – люциферина в случае биолюминесценции и легко доступной небольшой органической молекулы в хемилюминесценции. Для многих описанных в этой главе реакций удается сделать так, чтобы их скорость зависела только от концентрации определяемого вещества. В настоящее время единственный способ достижения этого состоит во введении избытка люминесцирующего соединения. В обычном анализе такое «буферирование» самим реагентом не представляет проблемы, но нужно проявить немало изобретательности, чтобы добиться того же эффекта в пределах ограниченного рабочего объема сенсора. Если, однако, допустить, что концентрация определяемого вещества не слишком отличается от нижней границы диапазона определяемых концентраций (это предположение вполне согласуется с исключительной чувствительностью метода), то нетрудно найти приемлемую конструкцию прибора. Интересным примером долговременного обеспечения природной люминесцентной системы люциферинной является сам светляк. Этот организм появляется из куколки со всем запасом люциферина, который необходим на время (около одного месяца) почти непрекращающегося импульсного свечения по ночам! Учитывая, что потребность фотоумножителей в фотонах существенно ниже интенсивности вспышки светляка, можно было бы оценить продолжительность работы сенсора. До такой оценки нельзя дать точный ответ на этот вопрос, однако в лучших случаях продолжительность работы сенсора не слишком отличается от срока службы ферментов, используемых в существующих биосенсорах. Хемилюминесцирующие соединения могут функционировать в виде твердых тел или паст; можно предусмотреть и удерживающие их полупроницаемые мембраны в сочетании с соответствующим образом измененными соединениями.

Наконец, следует остановиться на вопросе о помехах. Эту проблему трудно обсуждать в общем виде, поскольку существует много различных реакций, приводящих к люминесценции. Так, в присутствии железосодержащих соединений, например гема, люминол подвергается каталитическому окислению с испусканием света. Это, таким образом, исключает его использование для решения других задач в присутствии цельной крови. Мы разработали методику определения глюкозы в цельной крови с использованием акридиниевых эфиров, дающую прекрасные результаты, идентичные

получаемым в водном буферном растворе и сыворотке. В заключение отметим, что в настоящее время нельзя заявлять о готовности люминесцентных реакций для внедрения в реальные биосенсоры, однако их достоинства, заключающиеся в легкости детектирования и исключительной чувствительности, вполне оправдывают дальнейшие усилия исследователей в этом направлении.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Anderson J. M., Faini G. J., Wampler J. E., Stimson A.* Photometry and radiometry for Engineers. Interscience, New York, 1974.
2. Detection and measurement of free calcium in cells. Ashley C. C., Campbell A. K. (eds.). Elsevier-North Holland, Amsterdam, 1979.
3. *Baldvin T. O., Johnson T. C., Swanson R.* Recent progress in bioluminescence: Cloning of the structural genes encoding bacterial luciferase, analysis of the encoded sequences and crystallisation of the enzyme. In *Flavins and Flavoproteins* (eds. R. C. Bray, P. C. Engel, S. G. Mayhew), pp. 345–58. De Gruyter, Berlin, 1984.
4. *Brolin S. E., Berggren P. O., Naeser P.* Application of light guides for enhancement of signal to noise ratios at low levels of luminescence detectability. In *Analytical applications of bioluminescence and chemiluminescence* (eds. L. J. Kricka, P. E. Stanley, G. H. G. Thorpe, T. P. Whitehead), p. 479. Academic Press, London, 1984.
5. *Campbell A. K., Patel A.* A homogeneous immunoassay for cyclic nucleotides based on chemiluminescence energy transfer. *Biochem. J.*, **216**, 185–194 (1983).
6. *Carter T. J. N., Kricka L. J., Bullock D. G., Bunce R. A., Whitehead T. P.* Optimisation of luminescence instrumentation. In *Proc. International Symposium on Analytical Applications of Bioluminescence and Chemiluminescence* (eds. E. Schram, P. Stanley), pp. 637–51. State Printing and Publishing, Westlake Village, CA, USA, 1979.
7. *Charbonneau H., Walsh K. A., McCann R. O., Prendergast F. G., Cormier M. J., Vanaman T. C.* Amino acid sequence of the calcium-dependent photoprotein aequorin. *Biochem.*, **24**, 6762–71 (1985).
8. *Cormier M. J.* Comparative biochemistry of animal systems. In *Bioluminescence in action* (ed. P. J. Herring), pp. 75–108. Academic Press, London, 1978.
9. *Cormier M. J., Hori K., Karkhanis Y. D., Anderson J. M., Wampler J. E., Morin J. G., Hastings J. W.* Evidence for similar biochemical requirements for bioluminescence among the coelenterates. *J. Cell. Physiol.*, **81**, 291–7 (1973).
10. *Bioluminescence and chemiluminescence, Methods in enzymology.* DeLuca M. (ed.), Vol. 57, Academic Press, New York, 1978.
11. *DeLuca M.* Bioluminescence assays using co-immobilised enzymes. In *Analytical applications of bioluminescence and chemiluminescence* (eds. L. J. Kricka, P. E. Stanley, G. H. G. Thorpe, T. P. Whitehead), pp. 111–23. Academic Press, London, 1984.
12. *Freeman T. M., Seitz W. R.* Chemiluminescence fiber optic probe for hydrogen peroxide based on the luminol reaction. *Anal. Chem.*, **50**, 1242–6 (1978).
13. *Goto T., Fukatsu H.* Cypridina Luminescence. Chemiluminescence in micelle solutions—a model system of cypridina bioluminescence. *Tetrahedron Letters*, 4299–302 (1969).
14. *Gundermann K.-D.* Chemilumineszenz organischer verbindungen. Springer-Verlag, Berlin, 1968.
15. *Hallett M. B., Campbell A. K.* Applications of coelenterate luminescent proteins. In *Clinical and biochemical luminescence* (eds. L. J. Kricka, T. J. N. Carter), pp. 89–133. Dekker, New York, 1982.
16. *Hastings J. W.* Bacterial and dinoflagellate luminescent systems. In *Bioluminescence in action* (ed. P. J. Herring), pp. 129–70. Academic Press, London, 1978.
17. *Hastings J. W., Neilson K. H.* Bacterial bioluminescence. *A. Rev. Microbiol.*, **31**, 549–95 (1977).
18. *Hastings J. W., Baldwin T. O., Nicoli M. Z.* Bacterial luciferase: Assay, purification and properties. In *Methods in enzymology* (ed. M. DeLuca), Vol. 57, pp. 135–52. Academic Press, New York, 1978.
19. *Bioluminescence in action.* Herring P. J. (ed.). Academic Press, London, 1978.
20. *Jablonski E. G., DeLuca M.* Purification and properties of the NADH and NADPH specific FMN oxidoreductases from *Beneckea harveyi*. *Biochem.*, **16**, 2932–6 (1977).
21. *Jablonski E. G.* Analytical applications of bioluminescence: Marine bacterial system. In *Clinical and biochemical luminescence* (eds. L. J. Kricka, T. J. N. Carter), pp. 75–87. Dekker, New York, 1982.
22. *Kohen F., Bayer E. A., Wilchek M., Barnard G., Kim J. B., Collins W. P., Beheshti I., Richardson A. P., McCapra F.* Development of luminescence based assays for haptens and protein hormones. In *Analytical applications of bioluminescence and chemiluminescence* (eds. L. J. Kricka, P. E. Stanley, G. H. G. Thorpe, T. P. Whitehead), pp. 149–58. Academic Press, London, 1984.
23. *Clinical and biochemical luminescence.* Kricka L. J., Carter T. J. N. (eds.). Dekker, New York, 1982.
24. *Analytical applications of bioluminescence and chemiluminescence.* Kricka L. J., Stanley P. E., Thorpe G. H. G., Whitehead T. P. (eds.). Academic Press, London, 1984.

25. Kricka L. J., Wienhausen G. K., Hinkley J. E., DeLuca M. Automated bioluminescence assays for NADH, glucose-6-phosphate, primary bile acids and ATP. *Anal. biochem.*, **129**, 392–401 (1983).
26. Lamola A. A., Turro N. J. Energy transfer and organic photochemistry. In *Technique of organic chemistry* (ed. A. Weissberger), Vol. 14, Wiley, New York, 1969.
27. Lundin A. Analytical applications of bioluminescence: the firefly system. In *Clinical and biochemical luminescence* (eds. L. J. Kricka, T.J.N. Carter), pp. 43–74. Dekker, New York, 1982.
28. Maier C. L. Assay of pharmacologically, immunologically and biochemically active compounds in biological fluids. U.S. Patent, 4, 104,029, 1978.
29. McCapra F. The chemiluminescence of organic compounds. In *Progress in Organic Chemistry*, (eds. W. Carruthers, J. K. Sutherland), Vol. 8, pp. 231–77. Butterworths, London, 1973.
30. McCapra F. The chemistry of bioluminescence. *Acct. Chem. Res.*, **9**, 201–8 (1975).
31. McCapra F. The chemistry of bioluminescence. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, **215**, 247–72 (1982).
32. McCapra F., Manning M. Bioluminescence of coelenterates: chemiluminescent model compounds. *Chem. Commun.*, 467–8 (1973).
33. McCapra F., Chang Y. C., Francois V. The chemiluminescence of a firefly luciferin analogue. *Chem. Commun.*, 22–3 (1968).
34. McCapra F., Roth M., Hysert D., Zaklika K. A. Model compounds in the study of bioluminescence. In *Chemiluminescence and bioluminescence* (eds. M. J. Cormier, D. M. Hercules, J. Lee), pp. 313–23. Plenum Press, London, 1973.
35. Michelson A. M. Purification and properties of *Pholas dactylus* luciferin and luciferase. In *Methods in enzymology*. Vol. 57 (ed. M. DeLuca), pp. 385–406. Academic Press, New York, 1978.
36. Mulkerin M. G., Wampler J. E. Assaying hydrogen peroxide using the earthwork system. In *Methods in enzymology*. Vol. 57 (ed. M. DeLuca), pp. 375–81. Academic Press, New York, 1978.
37. Patel A. The development of homogeneous chemiluminescence immunoassay, Ph. D. Thesis, the University of Wales, Cardiff, Wales, UK, 1983.
38. Patel A., Campbell A. K., McCapra F. Chemiluminescence energy transfer: a new technique applicable to the study of ligand-ligand interactions in intact cells. *Anal. Biochem.*, **129**, 162–9 (1983).
39. Rauhut M. M. Chemiluminescence. In *Kirk-Othmer encyclopedia of chemical technology*. Vol. 5, 1979, p. 416.
40. Reynolds G. T. Applications of photosensitive devices of bioluminescence studies, *Photochem. Photobiol.*, **27**, 405 (1978).
41. Reynolds G. T. Localisation of free ionised calcium in cells by means of image intensification. In *Detection and Measurement of Free Calcium Ions* (eds. C. C. Ashley, A. K. Campbell), p. 227. Elsevier - North Holland, Amsterdam, 1979.
42. Richardson A. P. Hovel chemiluminescence immunoassays. Ph. D. Thesis, University of Sussex, England, 1985.
43. Roda A., Girotta S., Ghini S., Grigola B., Carrea G., Bovara. Development of a continuous-flow analysis for serum and salivary bile acids using bacterial bioluminescent enzymes immobilized on nylon coil. In *Clinical and biochemical luminescence* (eds. L. J. Kricka, T.J.N. Carter), p. 129. Dekker, New York, 1984.
44. Roswell D. F., White E. H. Chemiluminescence of luminol and related hydrazides. In *Methods in enzymology*, 57 (ed. M. DeLuca), p. 409. Academic Press, New York, 1978.
45. Salerno R., Moneti G., Magini A., Tomasi A., Pazzagli M. Evaluation of luminescent immunoassay methods for urinary steroids. In *Analytical applications of bioluminescence and chemiluminescence* (eds. L. J. Kricka, P. E. Stanley, G.H.G. Thorpe, T. P. Whitehead), p. 179. Academic Press, London, 1984.
46. Schroeder H. R., Boguslaski R. C., Carrico R. J., Buckler R. T. Monitoring specific protein binding reactions with chemiluminescence. In *Methods in enzymology* 57 (ed. M. DeLuca), pp. 424–45. Academic Press, New York, 1978.
47. Schuster G. B. Chemiluminescence of organic compounds: conversion of ground state reagents to excited state products by the CIEEL mechanism. *Acct. Chem. Res.*, **12**, 366–73 (1979).
48. Seliger H. H., McElroy W. D. Pathways of energy transfer in bioluminescence. *Radiation Res. Suppl.* **2**, 528–38 (1960).
49. Stanley P. E. Instrumentation. In *Clinical and biochemical luminescence* (eds. L. J. Kricka, T.J.N. Carter), pp. 219–260. Dekker, New York, 1982.
50. Strehler B. L. Bioluminescence assay: principles and practice. *Methods Biochem. Anal.* **16**, 99–181 (1968).
51. Tseng S., Rauhut M. M. *Europ. Pat. Appl.* No. 811 003 69.8, 1981.
52. Tsuji F. I. Cypridina luciferin and luciferase. In *Methods in Enzymology* 57 (ed. M. DeLuca), pp. 364–72. Academic Press, New York, 1978.
53. Ward W. W., Cormier M. J. An Energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. *J. Biol. Chem.*, **254**, 781–88 (1979).

54. *Weeks I., Campbell A.K., Woodhead J.S.* Two-site immunochemiluminometric assay for human alpha-fetoprotein. *Chin. Chem.*, **29**, 1480–3 (1983).
55. *Weeks I., Beheshti I., McCapra F., Campbell A.K., Woodhead J.S.* Acridinium esters as high specific activity labels in immunoassay. *Chin. Chem.*, **29**, 1474–9 (1983).
56. *Weeks I., Sturgess M., Siddle K., Jones M.K., Woodhead J.S.* A High sensitivity immunochemiluminometric assay for human thyrotropin. *Chin. Endocrinol.*, **20**, 489–95 (1984).
57. *White E.H., Miano J.D., Umbreit M.* On the mechanism of firefly luciferin luminescence. *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 198–200 (1975).
58. *Wilson T.* Chemiluminescence in the liquid phase. *Int. Sci. Rev.*, **9**, 265–322 (1976).
59. *Wienhausen G.K., Kricka L.J., Hinckley J.E., DeLuca M.* Properties of bacterial Luciferase/NADH-FMN oxidoreductase and firefly luciferase immobilised onto sepharose. *Appl. Biochem. Biotech.*, **7**, 463–72 (1982).
60. *Wynberg H., Meijer E.W., Hummelen J.C.* 1,2-Dioxetanes as chemiluminescent probes and labels. In *Bioluminescence and chemiluminescence* (eds. M. DeLuca, W.D. McElroy), pp. 687–9. Academic Press, New York, 1981.

Конструирование волоконно-оптических биосенсоров на основе биорецепторов

Джером С. Шульц

32.1. Введение

В последние годы важную роль стали играть разнообразные оптические волокна и оптоэлектронные устройства (как источники света, так и детекторы). Особый интерес к оптическим волокнам обусловлен тем, что они позволяют миниатюризировать спектрофотометрические приборы до такой степени, что становится возможным использовать пробы объемом порядка 0,1 мкл [2]. Оптические волокна уже используются в микроколориметрах и микрофлуориметрах [28]. Однако лишь недавно волоконную оптику стали сопрягать с биохимическими реакциями с целью создания миниатюрных биосенсоров.

Показано, что аналитические волоконно-оптические приборы можно использовать для контроля различных физических параметров, например температуры, определения рН и простых веществ типа CO_2 и O_2 [12, 16, 18]. Из недавних обзоров, посвященных разработке оптических биосенсоров, можно отметить работы [21] (см. гл. 30) и [17].

Авторы [20] предложили способ определения биологически активных веществ на основе конкурентного связывания этих веществ и их аналогов с флуоресцирующей меткой со специфическими рецепторами. В миниатюризованном варианте этой системы «пробиркой» является полое диализное волокно, в которое вставлено оптическое волокно, служащее для контроля спектроскопических изменений. Важная особенность метода заключается в том, что он является безреагентным. Используемые в системе реакции обратимы, а реагенты представляют собой высокомолекулярные соединения, удерживаемые в реакционной зоне диализной мембраной. Таким образом, система является замкнутой и не требует регенерации.

32.2. Оптические волокна

Базовая конструкция оптического волокна показана на рис. 32.1. Волокно состоит из сердцевинки и обкладки, изготовленных из таких материалов, чтобы показатель преломления света у сердцевинки был выше. В такой конструкции свет, входящий в волокно, претерпевает полное внутреннее отражение на границе раздела между двумя прозрачными материалами и направляется вдоль волокна. Современные материалы для изготовления оптических волокон имеют очень высокую степень очистки, так что ослабление света за счет поглощения или рассеяния относительно мало при длине волокна порядка нескольких метров. Такие волокна обычно и используются в большинстве представляющих интерес аналитических систем.

Используя волоконную оптику в биосенсорах, следует иметь в виду, что существуют два основных механизма взаимодействия света с окружением. Прежде всего свет исходит из конца сердцевинки. Если источником света служит лазер, то диаметр выходного пучка приблизительно равен диаметру входящего в волокно лазерного пучка. Такой цилиндрический пучок особенно важен для описываемых ниже методов

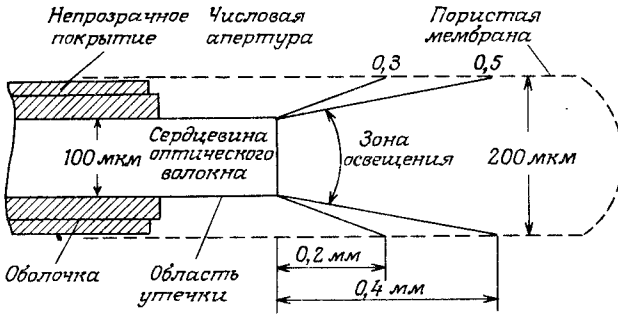


Рис. 32.1. Базовая конструкция оптического волокна, иллюстрирующая два механизма светового обмена: освещение анализируемой жидкости светом, выходящим в виде конуса из торца волокна либо проходящим в виде затухающей волны через боковую поверхность лишенной оболочки сердцевины. На практике используют только один из этих режимов.

разделения. Если же источником света является сфокусированный пучок света обычной лампы, то свет, покидая сердцевину, расходится в конус освещения, как показано на рис. 32.1. Рассеяние света в конус (называемое числовой апертурой волокна) зависит от разности показателей преломления материала сердцевины и внешней среды. На рис. 32.1 показаны типичные для серийно выпускаемых волокон области освещения. Активные биохимические компоненты биосенсора нередко защищают от внешнего окружения одним или несколькими слоями мембран, покрывающими конец оптического волокна. Характеристики этих мембран подбирают в соответствии с конкретными требованиями различных анализов.

По мере расширения области освещения (при удалении от торца волокна) интенсивность света уменьшается. Доля излучаемого при флуоресценции света, который возвращается в оптическое волокно и передается к детектирующей системе, также быстро падает с расстоянием. Определенное представление о влиянии геометрических факторов на детектирование дает рис. 32.2 (рассмотрен случай аксиального светового пучка). Общее количество света, возвращающегося в волокно, суммируется по всем точечным источникам света в области освещения, но для практических целей можно считать, что полезные сигналы, доходящие до детектора, исходят из зоны длиной около десяти диаметров волокна. Таким образом, как показано на рис. 32.3, для волокна диаметром порядка 200 мкм эффективная зона сенсора имеет длину около 2 мм.

Еще одним способом, позволяющим свету проникать во внешнюю среду, является удаление оболочки с части сердцевины. Если у последней показатель преломления выше, чем у внешней жидкости, свет, как и прежде, передается по волокну дальше, но

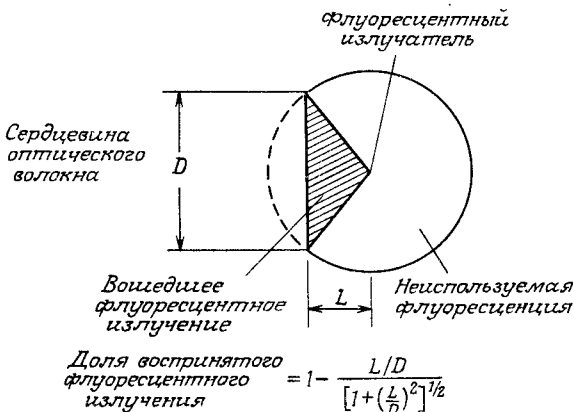
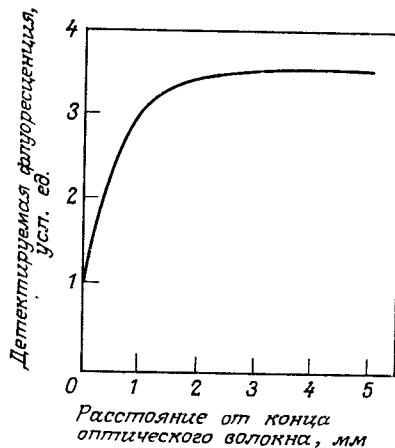


Рис. 32.2. Геометрическое представление светособирающей силы оптического волокна. Защищенная область представляет собой проекцию конуса света от точечного излучателя на ось оптического волокна.

Рис. 32.3. Влияние длины рабочей камеры на общее количество флуоресцентного излучения, детектируемого с помощью оптического волокна.



небольшая его часть все же попадает во внешнюю фазу в виде затухающей волны. Такая волна экспоненциально убывает с расстоянием от поверхности сердцевины, и для всех практических целей можно считать, что она эффективно действует только на расстояниях порядка 100 \AA .

32.3. Биосенсоры на основе биорецепторов

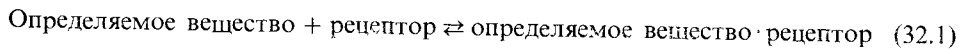
В этой главе мы ограничимся рассмотрением биосенсоров на основе обратимого связывания определяемых веществ со специфическими рецепторами. В биологии в среде аналитических методов этого типа чаще всего встречаются методы иммуноанализа с использованием специфических антител к низкомолекулярным гаптенам (в данном контексте – к определяемым веществам). Исходно в иммуноанализе для контроля степени связывания использовали радиоактивные метки. Однако в последние годы с этой целью все чаще прибегают к флуоресцентным меткам, исключая возможность радиационного поражения [24]. К счастью, большинство технологических приемов, разработанных для флуоресцентного иммуноанализа, можно легко приспособить и для биосенсоров.

Кроме антител, кандидатами в рецепторы для биосенсоров могут быть белки нескольких других классов, обладающие способностью к обратимому селективному связыванию. Так, лектины специфически связываются с различными сахарами [5]; выделены и описаны мембранно-связанные белки, специфичные к различным аминокислотам и сахарам [9]; ферменты обладают нереакционноспособными центрами связывания аллостерических эффекторов [10].

Обильную информацию о сродстве различных пар дает аффинная хроматография. При разработке методики очистки белков аффинной хроматографией оценивали многие комбинации рецепторов и лигандов [3]. Некоторые из этих систем, например, флавины и флавины-связывающие белки, можно было бы приспособить для использования в биосенсорах. Биосенсоры на основе обратимого связывания биорецепторов можно разделить на две категории – биосенсоры прямого и косвенного действия.

32.3.1. Биосенсоры прямого действия

В таких биосенсорах используется только обратимая реакция определяемого вещества с частицами рецептора:



Чтобы эту реакцию можно было непосредственно использовать, хотя бы у одной из трех частиц должен изменяться спектр. Так, если при связывании определяемого вещества меняется спектр поглощения рецептора, то, следя за этим изменением, можно непосредственно измерять степень связывания и, таким образом, определять интересующую концентрацию. Классический пример – изменение спектра гемоглобина при связывании кислорода. Хотя изменение цвета гемоглобина используют прежде всего для контроля степени его оксигенации, этот эффект пригоден и для решения обратной задачи – колориметрического определения парциального давления кислорода.

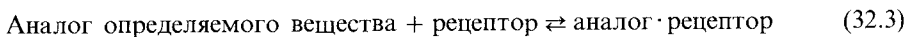
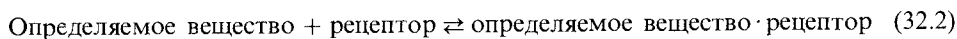
Конечно, поскольку реакция связывания кислорода с гемоглобином чувствительна к pH, концентрации диоксида углерода и температуре, это не лучший объект для конструирования на ее основе кислородного сенсора. Однако, она напоминает о том, что для любого сенсора необходимо оценивать влияние окружающих условий на способность рецептора к связыванию.

Еще одно, несколько более распространенное оптическое явление, используемое для определения глубины протекания реакции, состоит в тушении флуоресценции при связывании определяемого вещества с белком. Благодаря наличию групп триптофана большинство белков флуоресцирует при возбуждении зеленым светом. При связывании белка с определяемым веществом может происходить тушение флуоресценции, если спектр поглощения определяемого вещества перекрывается со спектром испускания триптофана. Примером флуоресцентного метода анализа, имеющего клиническое значение, является определение аминокликозидных антибиотиков, в частности гентамицина [23].

Следует отметить, что для систем прямого действия нет необходимости в мембране, отделяющей химические компоненты биосенсора от анализируемой жидкости, если рецептор предохраняется иммобилизацией на поверхности оптического зонда. Тем не менее наличие мембраны все же желательно, чтобы защитить рецепторный белок от некоторых компонентов внешнего раствора, например ферментов.

32.3.2. Биосенсоры косвенного действия

Если при связывании определяемого вещества с рецептором ни у того ни у другого спектр не изменяется, следует обратиться к аналогам определяемого вещества, которые могут давать какой-либо регистрируемый оптически сигнал. Химические процессы, протекающие в таких системах, в общем виде описываются следующими уравнениями:



где аналог определяемого вещества либо сам обладает спектральными свойствами, которые можно измерить, либо приводит к изменению оптических свойств при связывании с рецептором. Если как-либо контролировать глубину протекания второй реакции, то можно оценить, хотя и косвенно, концентрацию определяемого вещества, поскольку изменение концентрации последнего приводит к сдвигу равновесия во второй реакции. Возможности реализации этой концепции в биосенсорах обсуждаются ниже.

32.3.2.1. Методы пространственного разделения. Как уже отмечалось при описании характеристик оптических волокон, выходящий из оптического волокна пучок в той или иной степени сфокусирован в зависимости от источника света и апертурного числа оптического волокна. Это свойство можно успешно использовать при независимом мониторинге отдельных компонентов системы, если один из них иммобилизован вне «поля зрения» оптического волокна. На рис. 32.4,а показано устройство биосенсора, в котором эта задача решена.

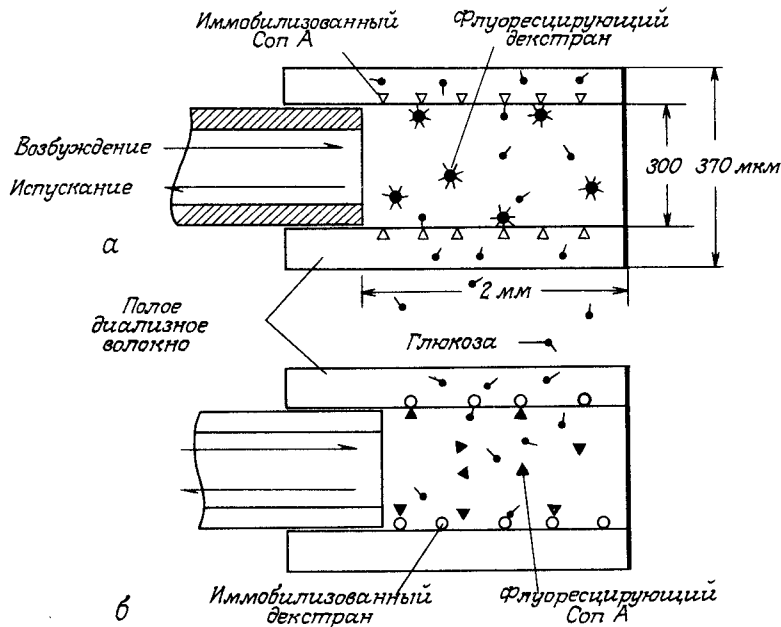


Рис. 32.4. Конструкции глюкозного биосенсора на основе принципа «разделения», т.е. измерения флуоресценции только несвязанных меченых макромолекул. а: глюкозный сенсор с иммобилизованным Cop A в качестве рецептора и декстран с флуоресцентной меткой в качестве свободно движущегося аналога определяемого вещества [19]; б: альтернативная схема глюкозного сенсора, в котором аналог анализируемого вещества, т.е. декстран, иммобилизован, а биорецептор, т.е. Cop A, несет флуоресцентную метку и подвижен.

В этом биосенсоре рецепторный белок иммобилизуют на внутренней поверхности полого диализного волокна, образующего измерительную камеру преобразователя. Эту конструкцию успешно использовали при разработке глюкозного сенсора [14, 19]. Специфическим рецептором для сахаров служил конканавалин А (Cop A), а высокомолекулярный (мол. масса 70 000) меченный флуоресцеином декстран (FITC-декстран) использовали как аналог определяемого вещества. Cop A ковалентно иммобилизовали в полую целлюлозную трубку вне поля зрения оптического волокна [22].

В отсутствие сахара наблюдаемый сигнал сенсора эквивалентен $\sim 20\%$ максимума флуоресценции. В результате множества опытов установлено [13], что базовый сигнал сенсора примерно на три четверти обуславливается свободным FITC-декстраном и на четверть — декстраном, связанным с Cop A на поверхности диализной трубки. При помещении сенсора в растворы с повышающейся концентрацией сахара все большее количество декстрана вытесняется со стенки в поле зрения оптического волокна. Постепенно при высоких концентрациях сахара весь декстран становится свободным, и дальнейшего увеличения флуоресценции не наблюдается. Приведенные на рис. 32.5 градуировочные кривые с насыщением типичны для систем, включающих связывание с рецептором. Упрощенные математические модели, описывающие такие системы, будут обсуждаться ниже.

Судя по градуировочным кривым для трех различных сахаров (рис. 32.5), чувствительность рассматриваемого сенсора зависит от константы связывания определяемого вещества с рецептором. Чувствительность данного сенсора к метилманиозиду более чем в десять раз превышает его чувствительность к глюкозе, причем средний уровень

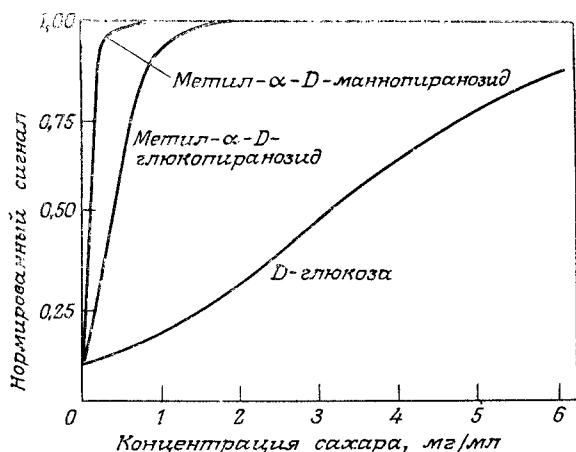


Рис. 32.5. Типичные градуировочные кривые глюкозного сенсора на основе Con A [13].

сигнала для производного маннозы соответствует концентрации последнего примерно 100 мкг/мл. Эти кривые показывают также, что если раствор содержит смесь сахаров, то выходной сигнал сенсора находится на уровне средневзвешенного из сигналов присутствующих в системе сахаров. К счастью, при использовании сенсора для контроля глюкозы в крови другие сахара, конкурирующие с глюкозой за места связывания, отсутствуют. Предельная чувствительность этого прибора определяется наименьшей концентрацией флуоресцеина, которую можно определить. Она составляет около 100 нг флуоресцеина/мл.

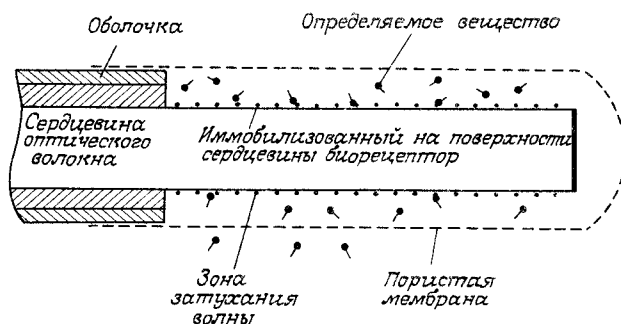
Следует отметить, что фактически такие же характеристики получились бы и в том случае, если бы Con A содержал метку флуоресцеина, а декстран (немеченный) — был иммобилизован на внутренней поверхности диализной трубки. Схема, изображенная на рис. 32.4,б, имела бы некоторые преимущества, если было бы легче вводить метку в Con A, чем в декстран, или если бы плотность иммобилизованного декстрана была выше плотности иммобилизованного Con A.

Вместо мониторинга свободных флуоресцирующих частиц можно было бы также измерять долю иммобилизованных флуоресцирующих частиц. Для этого существует ряд оптических методов, но наиболее изящным из них, возможно, является метод, предложенный в работе [7]. Рецептор закрепляется на участке сердцевины оптического волокна, очищенном от оболочки, как показано на рис. 32.6. Затухающая волна проникает в окружающую жидкость на глубину лишь около 100 Å. Таким образом, контролируется прежде всего абсорбционный слой, состоящий из молекул рецептора и связанного с ними определяемого вещества. Осуществимость такой схемы продемонстрирована в работе [1].

Чувствительность рассматриваемых методов можно повысить, используя флуориметрию с временным разрешением [25]. При этом подбирают флуоресцирующие частицы с относительно большим временем жизни после возбуждения (микросекунды, а не наносекунды, как в случае флуоресцеина). Это позволяет измерять интенсивность флуоресценции после выключения возбуждающего пучка света. Преимущество этого подхода состоит в том, что исключаются помехи, связанные с фоновым рассеянием возбуждающего пучка и фоновой флуоресценцией примесей (обычно короткоживущих).

Типичными флуорофорами, обладающими подходящими свойствами для флуориметрии временного разрешения, являются хелаты редкоземельных элементов. Так, в работе [11] показано, что «бифункциональные» хелатирующие агенты, используемые для ковалентного связывания хелатов тяжелых металлов с альбумином, позволяют

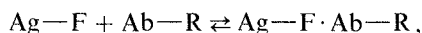
Рис. 32.6. Конфигурация биосенсора, в котором для детектирования иммобилизованных комплексов аналога определяемого вещества с биорецептором используется затухающая волна.



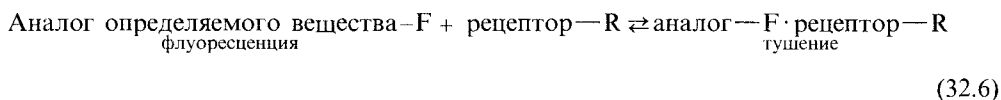
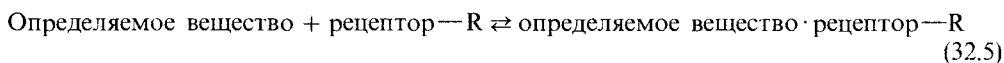
проводить определения на уровне микромолей. Для этой цели разработан специальный импульсный флуориметр [26].

32.3.2.2. Гомогенные аналитические системы. Существует ряд других оптических сенсоров косвенного действия, дополнительным преимуществом которых является то, что отпадает необходимость в иммобилизации.

Флуоресцентный перенос энергии. Концепция иммуноанализа с переносом энергии флуоресцентного возбуждения предложена и впервые практически реализована авторами [27]. Ее суть можно выразить следующей реакцией:



где F – флуоресцеин; R – родамин; Ag – антиген; Ab – антитело (рецептор). Флуоресценцию флуоресцеина возбуждают светом соответствующей частоты. Когда антиген (Ag–F) находится в свободной форме (левая часть уравнения), излучаемый свет детектируется оптической системой. С другой стороны, если флуоресцирующая частица располагается вблизи родамина (спектр поглощения которого перекрывается со спектром флуоресценции Ag–F), около 70% излучаемого света тушится путем прямого переноса энергии от флуоресцеина к родамину. Таким образом, оптический биосенсор можно сконструировать по схеме



Измеряя тушение флуоресценции, можно косвенно оценить концентрацию немеченого определяемого вещества, участвующего в конкурентном связывании.

Основным достоинством этого метода является то, что не требуется иммобилизации ни рецептора, ни аналога определяемого вещества, поскольку тушение происходит в растворе. Кроме того, контроль концентрации рецептора и аналога определяемого вещества в камере преобразователя является более полным, поэтому можно выбрать оптимальные условия, обеспечивающие максимальную чувствительность анализа. Расширяется также и выбор материалов для мембраны диализной трубки, поскольку можно не ограничиваться материалами, пригодными для иммобилизации и не придется искать компромисс между прочностью трубки и иммобилизационными свойствами.

В этом случае возможны по меньшей мере две конструкции биосенсора: с одним волокном (рис. 32.7,а) или же с пучком волокон (рис. 32.7,б). Преимуществом последней конструкции является то, что собирательная сила пучка волокон выше, и поэтому

толщину камеры (l) можно сделать очень маленькой, тем самым уменьшая диффузионный путь и время отклика системы.

Деполаризация флуоресценции. Альтернативой методу переноса энергии является метод деполаризации флуоресценции, предложенный авторами [4]. В основе последнего лежит различие скоростей вращательной диффузии свободного и связанного с рецептором аналога определяемого вещества. Когда аналог связан с высокомолекулярным рецептором, скорость его вращения замедляется, что приводит к уменьшению деполаризации испускаемого света. Таким образом, увеличение степени поляризации флуоресценции непосредственно связано с количеством связанного аналога. В наборах для иммуноанализа, основанного на этом принципе, можно использовать низкомолекулярные аналоги определяемых веществ, поскольку сохранение реагентов не составляет проблемы. В случае биосенсоров желательно, чтобы молекулы аналога были достаточно велики и удерживались диализной трубкой, так что молекулярная масса аналога должна быть порядка нескольких тысяч. Это, однако, приведет к снижению чувствительности метода, так как для больших молекул аналога различие скоростей вращательной диффузии в свободном и связанном состоянии уменьшается.

Обычные оптические волокна с трудом пропускают поляризованный свет, но недавние исследования показали, что использование специально подобранных стекол позволяет сохранять поляризацию при небольшой длине волокон. Для реализации принципа деполаризации флуоресценции можно было бы использовать конструкции сенсоров, аналогичные изображенным на рис. 32.7.

Турбидиметрический метод. Еще один способ оценки глубины протекания реакции между макромолекулярными аналогами определяемого вещества и рецепторами состоит в регистрации изменений интенсивности обратного рассеяния света (рис. 32.7). Для полимеров с диаметром молекул порядка десятков ангстрем интенсивность света, рассеянного в обратном направлении, пропорциональна квадрату молекулярного веса. Если, например, в глюкозном сенсоре в качестве аналога, конкурирующего с определяемым веществом, используется декстран с такой же молекулярной массой, как у

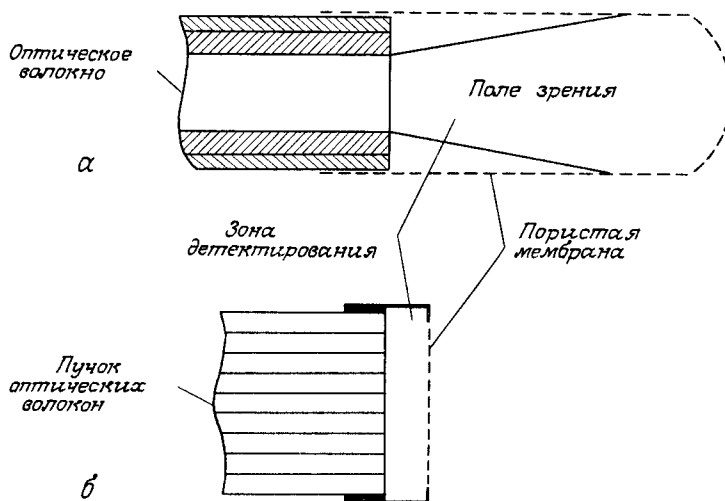


Рис. 32.7. Конфигурации биосенсоров на основе изменений спектров веществ при гомогенных реакциях. а: сенсор с одним оптическим волокном; б: сенсор с пучком оптических волокон и реакционной зоной толщиной l .

Con A ($\sim 60\,000$), то интенсивность света, рассеянного комплексом декстран–Con A, будет примерно в четыре раза больше, чем для каждого из этих компонентов в отдельности. Таким образом, по мере проникновения глюкозы в камеру сенсора равновесие реакции (32.3) смещается влево и соответственно уменьшается интенсивность рассеянного света.

32.4. Математические модели аналитических характеристик биосенсоров

Предполагая, что все протекающие в системе реакции находятся в равновесии, легко получить математическое описание биосенсоров, основанных на обратимом связывании с образованием простых одновалентных комплексов. Проблема практического достижения химического равновесия должна рассматриваться с учетом кинетики других процессов, влияющих на отклик сенсора. Например, в большинстве биосенсоров их химические компоненты и анализируемая жидкость разделены мембраной, и важным фактором, определяющим отклик сенсора в целом, является скорость диффузии определяемого вещества через мембрану(ы). Так, постоянная времени диффузии глюкозы через полую диализную трубку с толщиной стенки 30 мкм составляет более 5 мин [19]. Постоянная времени связывания глюкозы с ConA – величина порядка нескольких миллисекунд, и, таким образом, по сравнению с диффузионным процессом реакция связывания всегда равновесна. С другой стороны, взаимодействие некоторых антител и антигенов протекает довольно медленно. Так, по данным [6], для моноклональных антифлуоресцильных антител диссоциация проходит на 50% за время от 10^{-2} до 10^3 с. Вообще для антител характерно, что чем выше константа сродства, тем ниже скорость диссоциации. В некоторых случаях процесс диссоциации длится часами, и тогда предположение о равновесии, очевидно, не выполняется.

32.4.1. Сенсоры прямого действия

В простейшем случае процесс связывания анализируемого вещества A с рецептором R с образованием комплекса A·R описывается уравнениями



$$[R]_{\text{общ}} = [R] + [A \cdot R] \quad (32.8)$$

$$[R]/[R]_{\text{общ}} = 1/[1 + ([A] K_a)], \quad (32.9)$$

где $[R]$ – концентрация свободного рецептора; $[R]_{\text{общ}}$ – общая концентрация рецептора; K_a – константа равновесия реакции связывания определяемого вещества с рецептором.

Таким образом, если рецептор R в свободном состоянии флуоресцирует, а при связывании его с A происходит тушение флуоресценции, то величина $[R]/[R]_{\text{общ}}$ характеризует интенсивность остаточной флуоресценции как функцию концентрации A. Как и в случае систем, описываемых изотермой Лэнгмюра, сигнал сенсора достигает половины максимального значения, когда величина $[A]$ численно равна K_a^{-1} . Отметим, что чувствительность системы этого типа не зависит от концентрации рецептора, и если детектирующее устройство способно измерять концентрации R в диапазоне $0,1 < [R]/[R]_{\text{общ}} < 0,9$, то это соответствует диапазону концентраций определяемого вещества $1/9 K_a < [A] < 9/K_a$.

32.4.2. Сенсоры косвенного действия

В общем случае градуировочные кривые сенсоров, основанных на равновесном связывании, имеют вид гиперболы, как видно из рис. 32.5 для глюкозного сенсора.

По практическим соображениям для достижения максимальной эффективности сенсора желательно, чтобы его фоновый сигнал был как можно ближе к нулю, а аналитический сигнал составлял от 50 до 80% максимального значения в ожидаемом диапазоне концентраций определяемого вещества. Критерии выбора рецептора R и аналога A* определяемого вещества A с учетом констант связывания (с образованием комплексов A·R и A·R*) и концентрационные эффекты можно оценить следующим образом. В простейшем случае реакции, протекающие в сенсоре, являются одно-молекулярными (более сложные системы будут рассмотрены ниже) и описываются уравнениями



В состоянии равновесия между всеми компонентами этих реакций выполняются следующие алгебраические уравнения:

$$K_a = [A \cdot R]/[A][R] \quad (32.13)$$

$$K_a^* = [A^* \cdot R]/[A^*][R], \quad (32.14)$$

где величины в квадратных скобках — концентрации соответствующих частиц.

Благодаря конструкции сенсора общее количество рецептора и лиганда-аналога все время сохраняется, и, таким образом, можно записать следующие уравнения материального баланса:

$$[R]_{\text{общ}} = [R] + [A \cdot R] + [A^* \cdot R] \quad (32.15)$$

$$[A^*]_{\text{общ}} = [A^*] + [A^* \cdot R], \quad (32.16)$$

где $[R]_{\text{общ}}$ и $[A^*]_{\text{общ}}$ — общие (или исходные) концентрации этих двух веществ в камере сенсора.

Решая четыре последних уравнения, можно найти отношение концентрации несвязанного детектируемого лиганда к его общей концентрации:

$$\left(\frac{[A^*]}{[A^*]_{\text{общ}}} \right)^2 + \frac{[A^*]}{[A^*]_{\text{общ}}} \left[\left(\frac{[R]_{\text{общ}}}{[A^*]_{\text{общ}}} - 1 \right) + \frac{K_a[A] + 1}{[A^*]_{\text{общ}} K_a^*} \right] - \frac{K_a[A] + 1}{[A^*]_{\text{общ}} K_a^*} = 0 \quad (32.17)$$

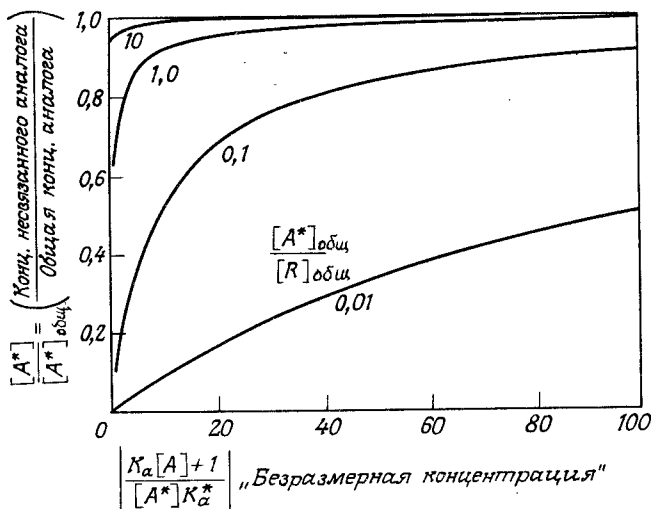


Рис. 32.8. Построенный по уравнению 32.17 параметрический график, представляющий ожидаемое отношение концентрации несвязанного аналога определяемого вещества к его общей концентрации в рабочей камере как функцию безразмерной комбинации параметров $(K_a[A] + 1)/([A^*]_{\text{общ}} \cdot K_a^*)$, которая непосредственно зависит от концентрации несвязанного определяемого вещества. Кривые с параметром $[A^*]_{\text{общ}}/[R]_{\text{общ}}$ характеризуют соотношение концентраций аналога и биорецептора в рабочей камере.

В нормированном виде выходной сигнал сенсора выражается отношением $[A^*]/[A^*]_{\text{общ}}$, меняющимся от 0 до 1. Таким образом, чувствительность сенсора в некоторой степени зависит от количества аналога анализируемого вещества $[A^*]_{\text{общ}}$ в сенсоре. Практически допустимая минимальная концентрация лиганда-аналога в сенсоре зависит от способности оптической системы регистрировать слабую флуоресценцию и от возможного присутствия мешающих веществ, например билирубина, в крови.

Из уравнения (32.17) видно, что нормированный сигнал является функцией двух комбинаций параметров: $[R]_{\text{общ}}/[A^*]_{\text{общ}}$ и $(K_a[A] + 1)/([A^*]_{\text{общ}} \cdot K_a^*)$. Последняя комбинация содержит независимую переменную, концентрацию определяемого вещества $[A]$, которая и представляет основной интерес. Таким образом, безразмерный график зависимости $[A^*]/[A^*]_{\text{общ}}$ от $(K_a[A] + 1)/([A^*]_{\text{общ}} K_a^*)$ полностью характеризует систему (рис. 32.8).

Из рис. 32.8 видно, что при низких значениях $[R]_{\text{общ}}/[A^*]_{\text{общ}}$ сенсор слабо реагирует на изменение концентрации определяемого вещества. Физически это условие отвечает ситуации, когда концентрация аналога так велика по сравнению с количеством рецептора, что несвязанный аналог присутствует в большом избытке. Поэтому дополнительное вытеснение лиганда-аналога с рецепторных центров определяемым веществом почти не влияет на концентрацию свободного аналога. Отсюда ясно, что у биосенсоров этого типа можно получить хорошую градуировочную кривую в представляющем интерес диапазоне концентраций, лишь если $[R]_{\text{общ}}/[A^*]_{\text{общ}} \gg 1$.

Тот же принцип можно рассмотреть и с другой точки зрения. Для удобства работы желательно, чтобы сигнал был малым при малых концентрациях определяемого вещества и большим при максимальных концентрациях, ожидаемых в каждом конкретном случае. Этому условию отвечает значение величины $[R]_{\text{общ}}/[A^*]_{\text{общ}}$ порядка 10. С другой стороны, при более высоких значениях $[R]_{\text{общ}}/[A^*]_{\text{общ}}$ (порядка 100) возможны другие проблемы, связанные с тем, что реальная концентрация аналога определяемого вещества может оказаться слишком низкой для детектирования оптической системой.

Следуя этим рассуждениям, можно оценить значения физико-химических констант, необходимые для какого-либо конкретного приложения сенсора. Во-первых, желательно, чтобы при концентрации определяемого вещества, равной нулю, выходной сигнал сенсора был мал. Подставляя значения $[A] = 0$, $[R]_{\text{общ}}/[A^*]_{\text{общ}} = 10$ и минимальное значение отклика сенсора $[A^*]/[A^*]_{\text{общ}} = 0,1$, из уравнения (32.17) находим, что член $[A^*]_{\text{общ}} K_a^*$ должен быть порядка 1,0.

Тогда, чтобы при концентрации определяемого вещества в середине исследуемого диапазона $[A']$ сигнал был на уровне 50% максимального значения, произведение $K_a[A']$ должно быть порядка 10, если $[A^*]/[A^*]_{\text{общ}}$ положить равным 0,5. Рассмотрим, к примеру, глюкозный сенсор. У больных диабетом концентрация глюкозы составляет 1–5 мг/мл и, таким образом, $[A']$ равно 5 мг/мл или $\sim 0,025$ М. Константа связывания глюкозы с Con A (K_a) составляет около 320 M^{-1} . Максимальное количество Con A, которое можно иммобилизовать на внутренней поверхности полый диализной трубки, эквивалентно эффективной концентрации 10^{-5} М. Константа связывания FITC-декстрана (молекулярная масса 70000) с Con A составляет около $7,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, а общая концентрация меченого декстрана в сенсоре около $1,5 \cdot 10^{-6}$ М. Отсюда при концентрации глюкозы 2,5 мг/мл значение величин $K_a[A']$ и $[R]_{\text{общ}}/[A^*]_{\text{общ}}$ составляют соответственно 6 и 7, т.е. попадают в приведенные выше диапазоны значений для этих критериев.

Приведенные рассуждения позволяют сформулировать следующие правила конструирования биосенсора.

1. Оцените среднюю концентрацию определяемого вещества $[A']$.
2. Выберите биорецептор с численным значением константы связывания порядка $10/[A']$.

3. Оцените минимальную концентрацию лиганда-аналога, детектируемого оптической системой $[A]_m$. Желательно, чтобы величина $[A^*]_{\text{общ}}$ была порядка $50 [A]_m$.

4. Выберите, синтезируйте или модифицируйте такой конкурентный аналог определяемого вещества, чтобы удовлетворялся критерий $K_a^* = 1/[A]_m$.

5. Разработайте методику заполнения рабочей камеры сенсора биорецептором в таком количестве, чтобы суммарная концентрация центров связывания была порядка $100 [A^*]_{\text{общ}}$.

32.4.3. Сенсоры с многовалентным связыванием

До сих пор мы ограничивали обсуждение системами, в которых взаимодействие лигандов и рецепторов описывается моновалентными реакциями. Фактически, однако, большинство антител по меньшей мере двухвалентны (т.е. имеют два рецепторных центра), а многие и поливалентны. Конканавалин А имеет, например, четыре рецепторных центра. Точно так же и гаптены (аналоги определяемых веществ) обычно содержат несколько активных групп. Таким образом, приведенные выше простые модели неверны для этих более сложных систем. Общая математическая теория таких систем пока еще только разрабатывается [15]. Однако в первом приближении для оценки свойств биосенсора можно использовать описанный выше подход с псевдомоновалентными константами связывания. Например, как уже отмечалось, константа связывания глюкозы с Con A составляет около 320 M^{-1} , тогда как для FITC-декстрана (линейного полимера глюкозы, содержащего множество боковых глюкозных групп) эффективная константа связывания с Con A равна около $7,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, или в 20 раз выше.

32.5. Заключение

Миниатюризация аналитических приборов, основанных на регистрации света, с помощью систем волоконной оптики предоставляет неисчерпаемые возможности для использования в биосенсорах. Быстрое развитие оптикоэлектронных приборов: твердотельных лазеров, интегральных оптикоэлектронных схем, новых типов оптических волокон, соединителей, мультиплексоров – в будущем обещает миниатюризацию не только сенсоров, но и вообще измерительного оборудования. Кроме того, достижения молекулярной биологии и особенно белковой инженерии сделают возможным конструирование для биосенсоров специальных рецепторов с желаемыми характеристиками. Эти два направления приведут к появлению совершенно нового поколения высокоселективных миниатюрных, портативных, стабильных и недорогих биосенсоров, которые можно будет применять как в медицине, так и в промышленности.

Благодарность

Работа частично поддерживалась грантом National Institute of Health (США) P01 AM 26858.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Andrade J. D., VanWagenen R. A., Gregonis D. E., Newby K., Lin J. N.* Remote fibre-optic biosensors based on evanescent-excited fluoroimmunoassay: Concept and Progress. *IEEE Trans. Electron Devices* **ED-32**, 1175-9 (1985).
2. *Chabay I.* Optical waveguides. *Anal. Chem.*, **54**, 1071A-80A (1982).
3. *Affinity chromatography and biological recognition.* Chaiken I., Wilchec M., Paritch I. (eds.). Academic Press, New York, 1984.
4. *Dandlicher W., Sausse V. A.* Review of fluorescence polarization in immunochemistry. *Immunochem.*, **7**, 799-805 (1970).

5. Goldstein I. J., Hayes C. E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. In *Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry* (eds. R. S. Typson, D. Horton). Vol. 35, 1978, p. 127-145.
6. Kranz D. M., Herron J. N., Voss E. W., Jr. Mechanisms of ligand binding by monoclonal antiluoresyl antibodies. *J. Biol. Chem.*, **257**, 6987-95 (1982).
7. Kronick N. M., Little W. A. J. *Immunol. Methods*, **8**, 235-240, 1975.
8. Lacey E. A. *Fiber optics*. Prentice Hall, Englewood, NJ, USA, 1982.
9. Landich R., Oxender D. Periplasmic binding proteins. In *Membranes and Transport* (ed. Martonosi), Vol. 2, pp. 81-88. Plenum, New York, 1982.
10. Lehninger A. *Biochemistry*. Worth, New York, 1970.
11. Leung C., Mears C. Attachment of fluorescent metal chelated to macromolecules using "bifunctional" chelating agents. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **75**, 149-55 (1977).
12. Lubbers D. W., Opitz N. Blood gas analysis with fluorescent dyes as an example of their usefulness as quantitative chemical sensors. In *Proc. intl. mtg. chemical sensors*, Fukuoda, Japan. Elsevier, Amsterdam, 1983.
13. Mansouri S. Optical glucose sensor based on affinity binding. Ph.D. Thesis, University of Michigan, 1983.
14. Mansouri S., Schultz J. S. A miniature optical sensor based on affinity binding. *Biotechnology*, **2**, 385-90 (1984).
15. Perelson A. S. Some mathematical models of receptor clustering by multivalent ligands. In *Cell surface dynamics: concepts and models* (eds. A. S. Perelson, C. DeLisi, F. W. Wiegel), pp. 223-276. Marcel Dekker, New York, 1984.
16. Peterson J. I., Goldstein S. R., Fitzgerald R. V., Ruckold D. K. Fiberoptic pH probe for physiological use. *Anal. Chem.*, **52**, 864-9 (1980).
17. Peterson J. I., Vurek G. G. Fiber-optic sensors for biomedical applications. *Science*, **224**, 123-7 (1984).
18. Saari L., Seitz W. R. pH sensor based on immobilized fluorescein amine. *Anal. Chem.*, **54**, 821-3 (1982).
19. Schultz J. S., Mansouri S., Goldstein I. J. Affinity sensor: a new technique for developing implantable sensors for glucose and other metabolites. *Diabetes Care*, **5**, 245-53 (1982).
20. Schultz J. S., Sims G. *Biotech. Bioeng. Symp.*, **9**, 65-71, 1979.
21. Seitz W. R. Chemical sensors based on fiber optics. *Anal. Chem.*, **56**, 16A-34A (1984).
22. Sirinivasan K. R., Mansouri S., Schultz J. S. Coupling of Concanavalin A to cellulose hollow fibers for use in a glucose affinity sensor. *Biotech. Bioeng.*, **28**, In press (1986).
23. Shaw E. J., Watson R. A. A., London J., Smith D. S. Estimation of serum gentamicin by quenching fluoroimmunoassay. *J. Clin. Pathol.*, **30**, 562-31 (1977).
24. Smith D. S., Al-Hakim M., London J. A review of fluorimmunoassay and immunofluorimetric assay. *Anal. Clin. Biochem.*, **18**, 253-274 (1981).
25. Soini E., Hemmila I. Fluorimmunoassay: present status and key problems. *Chin. Chem.*, **25**, 353-61 (1979).
26. Soini E., Kojola H. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates - a new generation of nonisotopic immunoassays. *Clin. Chem.*, **29**, 65-8 (1983).
27. Ullman E. F., Schwarzberg M., Rubenstein K. Fluorescent excitation transfer immunoassay, a general method for determination of antigens. *J. Biol. Chem.*, **251**, 4172 (1976).
28. Vurek G. G., Bowman R. L. Fiber-optic colorimeter for submicroliter samples. *Anal. Biochem.*, **29**, 238-47 (1969).

Спектроскопия внутреннего отражения в оптическом иммуноанализе

Ранальд М. Сазерлэнд, Клаус Дене

33.1. Введение

Спектроскопия внутреннего отражения (СВО) — хорошо известный метод изучения реакций в расположенном вблизи непрерывной поверхности слое толщиной порядка длины волны света. В основе СВО лежит явление отражения света на границе между двумя прозрачными средами с различными показателями преломления. При полном внутреннем отражении светового пучка в оптически более плотную среду в оптически менее плотной среде вблизи отражающей поверхности генерируется электромагнитная волна. Эта волна является частью отражаемого светового пучка и соответствует той небольшой доле света, который проникает в среду с меньшим показателем преломления. Эта затухающая электромагнитная волна и является тем самым «чувствительным» элементом, который оптически взаимодействует с соединениями, находя-

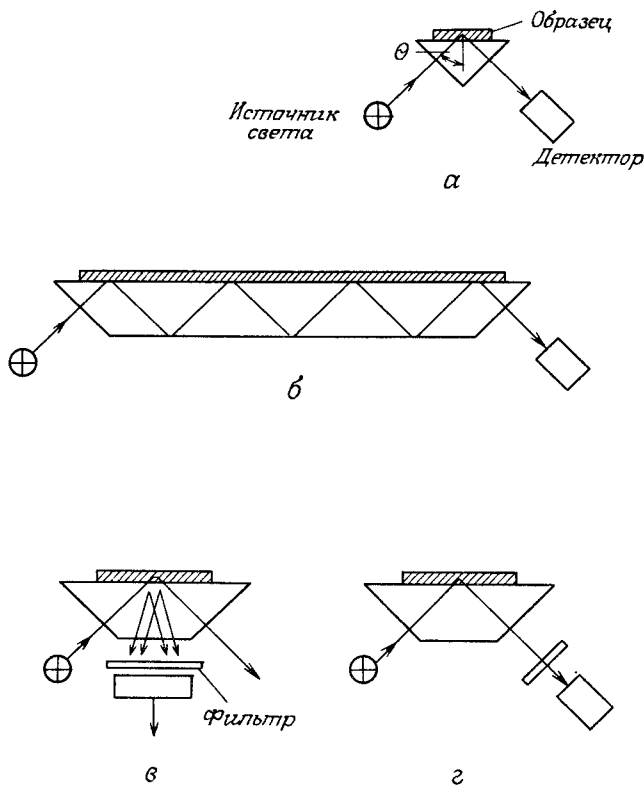


Рис. 33.1. Схемы различных элементов внутреннего отражения. а: призма с однократным отражением; б: элемент с многократным внутренним отражением; в: детектирование флуоресценции под прямым углом; г: детектирование флуоресценции по ходу отраженного луча.

щимися вблизи или на исследуемой поверхности. За оптическим взаимодействием в данной системе можно следить по изменению интенсивности света, который выходит из оптически более плотной среды. Последнюю обычно называют элементом внутреннего отражения (ЭВО). Конструктивно ЭВО могут быть выполнены в виде элементов однократного и многократного отражения (рис. 33.1, *a* и *б* соответственно). Элементы многократного отражения называют также световодами и волноводами. СВО-сенсор позволяет непрерывно контролировать реакции на границе раздела фаз при минимальных помехах от соединений, находящихся вдали от волноводной поверхности (на расстоянии, большем длины волны света).

Ранее применение СВО-устройств в биологии было связано главным образом с исследованиями взаимодействия белков с различными поверхностями или на поверхностях, которые подвергали предварительной обработке, чтобы сделать их гидрофобными или гидрофильными. Для изучения таких взаимодействий обычно использовали два оптических метода – нарушенное полное внутреннее отражение (НПВО) и НПВО с флуоресценцией (НПВОФ). НПВО определяют как «отражение в условиях, когда в процессе полного внутреннего отражения действует какой-то сопряженный механизм поглощения света, вследствие чего коэффициент отражения становится меньше единицы» [16]. Это означает, что при наличии поглощающей свет пленки на волноводной границе раздела энергию поглощенной пленкой затухающей волны можно оценивать по ослаблению внутренне отраженного светового пучка. Спектроскопию НПВО широко применяют для изучения взаимодействия белков на поверхностях [3, 4] в инфракрасной области спектра. Объединение НПВО и инфракрасной фурье-спектроскопии позволяет быстро получать полные спектры белков, адсорбированных на поверхности германиевого волновода [14, 15].

НПВО в сочетании с методами флуоресценции также используют для изучения взаимодействия белков на поверхностях. НПВОФ можно рассматривать как разновидность НПВО, поскольку первой стадией НПВОФ является поглощение фотонов затухающей волны связанными с поверхностью молекулами и уже на второй стадии происходит переизлучение света большей длины волны, т.е. собственно флуоресценция. В работе [17] с помощью НПВОФ следили за связыванием меченого дансил-хлоридом бычьего сывороточного альбумина (БСА) с поверхностью кварцевого волновода. Этим же методом исследовали связывание меченого флуоресцеином (FITC) бычьего γ -глобулина [52] и FITC–БСА [28, 29] с поверхностью силиконовой резины. Для изучения связывания БСА с поверхностью кварцевого волновода в работах [50, 51] использовали собственную флуоресценцию триптофановых остатков белка.

НПВОФ применяют в сочетании еще с двумя методами регистрации. Авторы [5] использовали фотовысвечивание для изучения тетраметилродамин–БСА, адсорбированного на кварцевой пластинке. Для исследования взаимодействия меченных родамином IgG и инсулина с кварцевой пластинкой, покрытой БСА, в работе [49] применен метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии.

Потенциальные преимущества использования СВО-устройств в иммуноанализе обусловлены главным образом тем, что они позволяют с высокой чувствительностью контролировать поверхностные реакции. Обычные (см. например [21]) методики иммуноанализа являются многостадийными, включают несколько инкубаций и отделение связанных с антителами компонентов от несвязанных перед измерением сигнала, характеризующего связывание антител с антигенами. Стадия предварительного разделения является основным источником погрешности анализа, громоздка и явно требует какого-то технического решения. На создание методов иммуноанализа без разделения (т.е. гомогенных методов) было нацелено довольно много исследований. В результате были созданы такие методы, как иммуноанализ с поляризацией флуорес-

ценции [9], лазерная нефелометрия [10], гомогенный иммуноферментный анализ (фирма Syva Corporation), которые уже применяются в клинических лабораториях. Однако все еще ощущается потребность в методе, пригодном как для исследовательских, так и для рутинных целей. СВО-устройства обеспечивают один из альтернативных подходов в гомогенном иммуноанализе, причем к их преимуществам относится возможность использовать различные оптические методы детектирования.

С точки зрения иммуноанализа ключевой характеристикой методов СВО является способность непосредственно следить за ходом поверхностных реакций без помех со стороны объема раствора. Основная идея метода заключается в фиксации одного из компонентов иммунной пары на поверхности волновода и контроле его реакции с комплементарным антигеном (или антителом), причем нет необходимости в формальной стадии разделения, поскольку происходит разделение *in situ* на поверхности волновода в оптически чувствительной зоне затухающей волны. Таким образом удастся избежать стадии физического разделения связанных с антителами и свободных молекул.

В следующих разделах рассмотрена теория некоторых оптических методов контроля поверхностных реакций с помощью затухающей волны, генерируемой при внутреннем отражении света; отмечены наиболее важные факторы, которые необходимо учитывать при проектировании оптических систем с элементами внутреннего отражения; дан обзор имеющейся литературы по применению СВО-устройств в иммуноанализе, и, наконец, обсуждаются перспективы развития этой области.

33.2. Теоретические аспекты

33.2.1. Принципы спектроскопии внутреннего отражения

Если граница раздела между двумя прозрачными средами освещается пучком света (рис. 33.2), проходящим к границе через среды с более высоким показателем преломле-

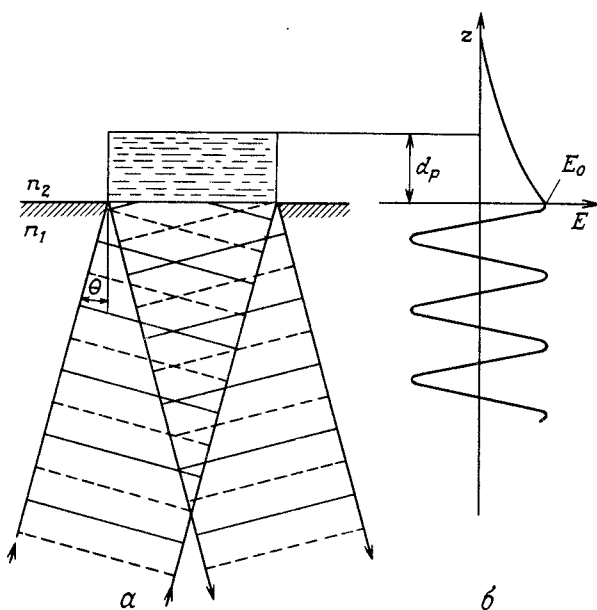


Рис. 33.2. Генерация затухающей волны на границе раздела между двумя оптическими средами. а: при $n_1 > n_2$ и $\theta > \theta_c$, где θ_c — критический угол отражения, затухающая волна возникает на отражающей поверхности; б: то же, что и а, но показана амплитуда электрического поля E по обе стороны отражающей поверхности при генерации затухающей волны (z — расстояние от отражающей поверхности в глубь менее плотной оптической среды; d_p — характерная глубина проникновения затухающей волны в эту среду).

ния ($n_1 > n_2$) под углом θ , и если θ больше критического значения θ_c :

$$\theta_c = \sin^{-1}(n_2/n_1), \quad (33.1)$$

то имеет место полное внутреннее отражение.

В этом случае затухающая волна проходит через отражающую поверхность в оптически менее плотную среду на расстояние d_p , имеющее тот же порядок, что и длина волны падающего света. В соответствии с уравнениями Максвелла в более плотной среде возникает стоячая синусоидальная волна, перпендикулярная отражающей поверхности (рис. 33.1,б). Хотя поток энергии в непоглощающую свет оптически менее плотную среду отсутствует, в этой среде имеется затухающее электромагнитное поле. Вследствие условия непрерывности поля амплитуда вектора электрического поля (E) имеет наибольшее значение на границе раздела фаз (E_0) и экспоненциально спадает при удалении от нее на расстояние (Z):

$$E = E_0 \exp(-Z/d_p). \quad (33.2)$$

Глубина проникновения d_p определяется как расстояние от поверхности, на котором амплитуда электрического поля уменьшается в e раз от значения на поверхности, и задается выражением

$$d_p = \frac{1/n_1}{2\pi [\sin^2\theta - (n_2/n_1)^2]^{1/2}}. \quad (33.3)$$

Отсюда видно, что величина d_p уменьшается с ростом θ и увеличивается по мере сближения показателей преломления (т.е. при $n_1/n_2 \rightarrow 1$). Кроме того, поскольку d_p пропорциональна длине волны, d_p тем больше, чем больше длина световой волны.

Таким образом, путем тщательного выбора показателя преломления ЭВО n_1 , угла падения и длины волны света можно подобрать такое значение d_p , чтобы усилить взаимодействие света с соединениями, близко расположенными или фиксированными на границе раздела фаз, и свести к минимуму его взаимодействия с объемом растворов.

В качестве примера рассмотрим кварцевый волновод ($n_1 = 1,46$), находящийся в контакте с оптически менее плотной водной средой ($n_2 = 1,34$). Для этой системы θ_c равно 66° (см. уравнение (33.1)). В соответствии с (33.3) при $\theta = 70^\circ$ и $\lambda = 500$ нм глубина проникновения света в раствор d_p составляет приблизительно 270 нм. Оценка размеров молекулы IgG (антитела) дает приблизительно $10 \text{ нм} \times 6 \text{ нм}$ [1]. Таким образом, образующийся на поверхности иммунный комплекс сэндвич-типа из трех слоев IgG имеет средний диаметр около 25 нм. На таком расстоянии напряженность поля еще составляет 91% E_0 (см. уравнение (33.2)). Однако при удвоении или утроении этого расстояния напряженность поля экспоненциально падает соответственно до 83 и 76%.

Глубина проникновения является одним из четырех факторов, определяющих ослабление сигнала поглощающей пленкой при внутреннем отражении. Остальные три фактора — это поляризация, зависящая от напряженности электрического поля на отражающей границе раздела фаз; площадь зоны детектирования, которая увеличивается с ростом θ ; согласование показателей преломления оптически более и менее плотных сред, что в свою очередь контролирует степень их оптического сопряжения. Все эти факторы учитываются в эффективной толщине d_e , которая соответствует фактической толщине пленки, демонстрирующей такое же поглощение в эксперименте с пропусканием света.

Для повышения чувствительности часто используют элементы многократного отражения. Число отражений (N) является функцией длины (L) и толщины (T) волновода и угла падения (θ):

$$N = L/T \cdot \text{ctg}\theta. \quad (33.4)$$

Чем длиннее и тоньше волновод, тем больше N и тем чаще затухающая волна взаимодействует с поверхностным слоем, содержащим комплекс антитело–антиген. Если при однократном отражении коэффициент отражения R равен

$$R = 1 - \alpha d_e, \quad (33.5)$$

где α – коэффициент поглощения и d_e – эффективная толщина слабо поглощающего слоя, то после N отражений коэффициент отражения падает до

$$R^N = 1 - N \alpha d_e. \quad (33.6)$$

Затухающую волну используют для контроля поверхностных реакций в сочетании с несколькими оптическими методами. Особо отметим два основных способа оптического детектирования. Первый основан на поглощении света или флуоресценции определяемым веществом – это, например, НПВО и НПВОФ. Системы второго типа основаны на описываемом ниже эффекте поверхностного плазмонного резонанса, который обусловлен зависимостью показателя преломления тонких пленок, например иммунохимических, от толщины.

32.2.2. *Нарушенное полное внутреннее отражение и нарушенное полное внутреннее отражение с флуоресценцией*

При контакте поглощающего материала с отражающей поверхностью ЭВО получающийся внутренне отраженный пучок света, как уже говорилось, ослабляется [16]. В методе НПВО измеряют ослабление отраженного света как функцию его длины волны. В спектроскопии НПВОФ используют флуоресцирующие вещества и, таким образом, поглощенная энергия частично вновь излучается в виде флуоресцентного света, который и детектируется.

Для измерения флуоресценции на границе раздела волновод/жидкость можно использовать различные методы регистрации и обработки сигналов. Флуоресценцию на границе раздела фаз можно детектировать либо обычным способом, располагая детектор под прямым углом к поверхности (на рис. 33.1, в – справа), либо по ходу основного пучка (рис. 33.1, г). Поскольку при детектировании по ходу основного пучка телесный угол излучения света мал по сравнению с регистрацией под прямым углом, первый способ, казалось бы, менее эффективен. Однако существует эффект усиления, и теория предсказывает, что для волновода из плавленого кварца, контактирующего с водной средой (n_2), интенсивность флуоресценции по ходу основного пучка может быть в 50 раз выше, чем интенсивность флуоресцентного света, излученного под прямым углом к отражающей поверхности. Этот эффект – туннелирование флуоресцентного света обратно в волновод – подтвержден как теоретически, так и экспериментально [6, 26].

На словах его можно объяснить следующим образом. Падающая плоская волна генерирует затухающую волну, которая возбуждает молекулы вблизи поверхности, причем число возбужденных молекул пропорционально интенсивности электрического поля затухающей волны (см. уравнение 33.2). По истечении характеристического времени жизни в возбужденном состоянии эти молекулы испускают флуоресцентное излучение. Локальное распределение интенсивности флуоресценции вблизи поверхности весьма сходно с описываемым уравнением (33.2) распределением числа возбужденных молекул, т.е. теперь вместо затухающего исходного света мы имеем дело с затухающей флуоресценцией. На вопрос о том, что случится с затухающей флуоресцентной волной, можно ответить, воспользовавшись принципом оптической обратимости, который гласит, что излучаемый при флуоресценции свет возвращается в волновод в виде плоской волны так же, как в первичном процессе генерации затухающей волны исходным плоскополяризованным светом. Согласно теории, интенсивность флуоресцентного излучения достигает пикового значения при критическом

угле полного внутреннего отражения, так что может произойти его полное внутреннее отражение. Для повышения чувствительности ЭВО следует конструировать таким образом, чтобы можно было собирать флуоресцентное излучение после нескольких отражений и уже затем направлять в детектор.

Этот способ особенно выгоден, если в качестве ЭВО используют оптическое волокно, поскольку довольно трудно направить к детектору все испускаемое под прямым углом флуоресцентное излучение вытянутого в длину волокна. Детектирование по ходу отраженного пучка позволяет также измерять флуоресцентный свет, не прошедший через объем раствора вокруг волокна; в противном случае раствор может оказывать мешающее влияние (в зависимости от используемых флуоресцентных красителей) [45].

33.2.3. Поверхностный плазмонный резонанс

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР), называемый также осцилляциями поверхностных плазмонов, имеет вполне разработанную концепцию; в течение ряда лет этот метод изучали и теоретически, и экспериментально. Детальный обзор работ по методу осцилляций поверхностных плазмонов приведен в [41, 42]. Однако для химии и биологии это новый метод.

Поверхностные плазмоны существуют на границе твердого тела (металла или полупроводника), электроны которого ведут себя так, как квазиидеальный электронный газ. Плазмоны представляют собой квантовые осцилляции поверхностных зарядов, вызываемые на границе раздела внешним электрическим полем. Эти осцилляции связаны с высокочастотными электромагнитными полями, распространяющимися в пространстве вокруг твердого тела. Поверхностные плазмоны могут возбуждаться электронными пучками или светом. Различают два типа поверхностных плазмонов: излучательные и неизлучательные. Для сенсорных приложений наибольший интерес представляют неизлучательные плазмоны, возбуждаемые светом. Такие плазмоны характеризуются экспоненциальным убыванием электрического поля с расстоянием от границы. Неизлучательные поверхностные плазмоны не возбуждаются «непосредственно» освещением (т.е. светом, отраженным поверхностью металла), так как импульс падающих на поверхность фотонов слишком мал. Наиболее пригодный для сенсорных приложений метод заключается в возбуждении плазмонов затухающими волнами. При этом используют такой же измерительный оптический элемент, как в НПВО, или конструкцию с призмой (рис. 33.3) — призму Кречмана [22]. Сходство данного метода с НПВО видно уже из рис. 33.3. Как в случае обычного ЭВО, основой призмы Кречмана является стеклянная призма с показателем преломления n_1 . Свет падает на основание призмы под углом θ . Исследуемая область над основанием призмы имеет показатель преломления $n_3 > n_1$. Особенностью метода ППР является наличие слоя металла между призмой и исследуемым образцом. Если падающий свет является плоскополяризованным и угол падения θ таков, что импульс движения фотона вдоль поверхности совпадает с импульсом плазмона, то свет может сопрягаться с электронной плазмой в металле. В этом и состоит явление поверхностного плазмонного резонанса. Оно проявляется как резкое падение суммарной интенсивности отраженного света, измеряемой в виде зависимости пропускания от угла падения. Глубина и ширина этого резонансного минимума определяется коэффициентом поглощения и толщиной металлической пленки. Для данного металла можно подобрать такую толщину пленки, что интенсивность отраженного света в минимуме будет близка к нулю (для серебра, например, эта толщина составляет ~ 60 нм). Изменение длины волны падающего света может приводить к смещению положения и ширины минимума.

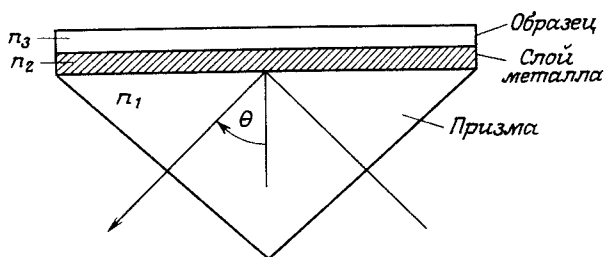


Рис. 33.3. Возбуждение излучательных плазмонов методом НПВО в призме Кречмана [22]: θ — угол падения света; n_1 , n_2 и n_3 — показатели преломления призмы, слоя металла и исследуемого образца соответственно.

На рис. 33.4 показано пространственное распределение плотности энергии $|H|^2$ при трех различных углах падения света и толщине слоя серебра 60 нм. При угле $\theta_0 = 50^\circ$ система выходит за область резонанса, энергия поля плазмы экспоненциально падает с расстоянием. Угол $\theta_0 = 45,4^\circ$ близок к резонансному, и энергия поля сначала падает, а затем возрастает, достигая наибольшего значения на границе. Угол $\theta_0 = 45,2^\circ$ является резонансным; плотность энергии поля на границе достигает максимального значения, которое примерно в восемь раз выше, чем в отсутствие резонанса. Таким образом, при резонансе поле проникает в металл (из воздуха на рис. 33.4) на ту же глубину, но будучи усилено в восемь раз по сравнению с НПВО без металлической пленки. В этом одна из причин высокой чувствительности метода ППР. Другой причиной является то, что положение угла резонансного минимума очень чувствительно к колебаниям показателя преломления среды вне металлической пленки. Например, при использовании серебряной пленки и гелий-неонового источника света замена воздуха ($n = 1,0$) водой ($n = 1,33$) приводит к сдвигу резонансного угла от 43° до 68° [27]. Поскольку электрическое поле зондирует среду только на расстояниях до нескольких сотен нанометров от поверхности металла, резонанс очень чувствителен к наличию тонких пленок на этой поверхности. Этот эффект, очевидно, можно использовать в сенсорах.

В качестве примера на рис. 33.5 показана зависимость резонансного минимума от

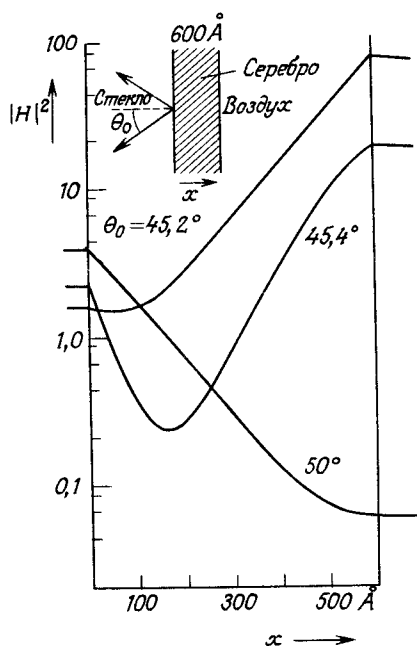


Рис. 33.4. Рассчитанная напряженность электромагнитного поля $|H(x)|^2$ в слое серебра толщиной 600 Å (среда: слева — стекло, справа — воздух) в зависимости от угла падения света фиксированной длины волны $\lambda = 6000 \text{ Å}$ (с разрешения автора [42]).

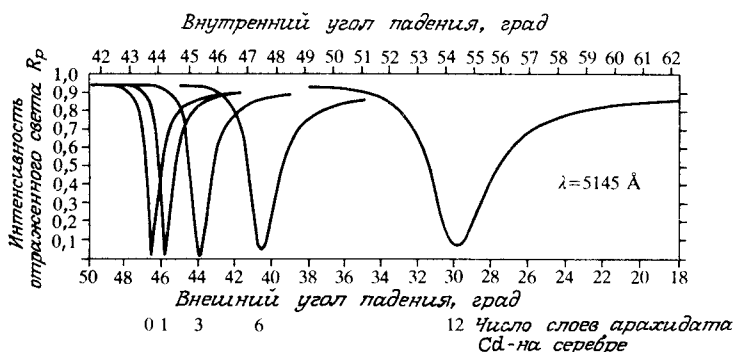


Рис. 33.5. Кривые нарушенного полного отражения света с длиной волны $\lambda = 5145 \text{ \AA}$ серебряными пленками, покрытыми различным числом монослоев арахидата кадмия (с разрешения авторов [39]).

числа Cd-арахидатных монослоев толщиной $26,8 \text{ \AA}$ каждый. Видно, что с увеличением числа слоев положение резонансного пика сдвигается в сторону больших углов, а его ширина увеличивается. Чувствительность такой системы очень высока: если разрешение оптической системы лучше $0,05^\circ$, то можно анализировать покрытия толщиной всего несколько ангстрем.

33.2.4. Эллипсометрия

Эллипсометрия является, вероятно, одним из наиболее распространенных методов измерения толщины тонких пленок на твердых подложках. Подробное обсуждение теории, аппаратуры и приложений читатель может найти во многих обзорах, например [2, 18, 35, 40, 43]. В эту главу эллипсометрия включена как один из наиболее чувствительных методов анализа тонких пленок. Хотя эллипсометрия основана на внешнем, а не внутреннем отражении, эллипсометрические измерения в тонких биологических пленках, видимо, также можно проводить с помощью волноводных систем однократного или многократного внутреннего отражения [7]. Правда, число публикаций о комбинации эллипсометрии с СВО весьма ограничено и пока не ясно, насколько этот метод полезен. Поэтому мы не будем обсуждать его подробно.

33.3. Практические соображения при выборе и использовании элементов внутреннего отражения

33.3.1. Элементы внутреннего отражения

Ключевым моментом при создании систем СВО является конструкция ЭВО. Геометрия ЭВО зависит как от природы исследуемого образца (обычно это небольшое количество жидкости), так и от используемой методики. В нашу задачу не входит детальное рассмотрение предъявляемых к ЭВО требований — все это читатель может найти в литературе к предыдущим разделам. Полезно, однако, выделить некоторые наиболее важные факторы, влияющие на генерацию затухающей волны на границе раздела между волноводом и жидкостью.

Разработано большое число ЭВО [16], простейшим из которых является однократно отражающая призма (рис. 33.1,а). Призму обычно используют при фиксированном угле (θ), а жидкость удерживается на отражающей поверхности с помощью проточной ячейки [50]. В общем случае призма с однократным отражением недостаточно

чувствительна для измерения поглощения света при иммуноанализе. Однако она вполне пригодна для получения спектров флуоресценции, регистрируемых под прямым углом, как изображено на рис. 33.1,в [50]. Для получения высокой чувствительности, требуемой для иммуноанализа с использованием НПВО, необходимы элементы с многократным внутренним отражением (например, плоские, как на рис. 33.1,б), поскольку увеличение числа отражений N усиливает контрастность измеряемого спектра (см. уравнение (33.6)). N возрастает, если сделать пластину длиннее и/или тоньше (см. уравнение (33.4)), правда, из практических соображений длина L и толщина T пластины ограничены. Например, при исследовании быстрых реакций пластина должна быть достаточно длинной (чтобы увеличить чувствительность) и в то же время достаточно короткой (чтобы избежать чрезмерного запаздывания). Кроме того, по мере уменьшения T уменьшается апертура, что ограничивает допустимую мощность светового потока. Если толщина пластины столь мала, что свет, фокусируемый на входной апертуре, заполняет ее целиком, возникают новые проблемы, связанные с возможным контактом уплотнительных прокладок проточной ячейки со светопроводящей зоной. В этом случае прокладки являются потенциальным источником световых потерь из-за поглощения, рефракции и рассеяния. Кроме того, во время опыта прокладки могут «сползать» с места. На рис. 33.6 показана конструкция ЭВО, исключаяющая контакт света с прокладкой, так как свет вводится в пластину через кварцевую призму, которая направляет свет мимо уплотнительной прокладки. В данной системе использовали призмы с переменным углом падения света, позволяющие изменять угол θ и, таким образом, контролировать глубину проникновения света в исследуемую жидкость (см. уравнение (33.3)), что позволяет получать более контрастные спектры. Значение θ изменяют путем линейного перемещения или поворота зеркала (рис. 33.6).

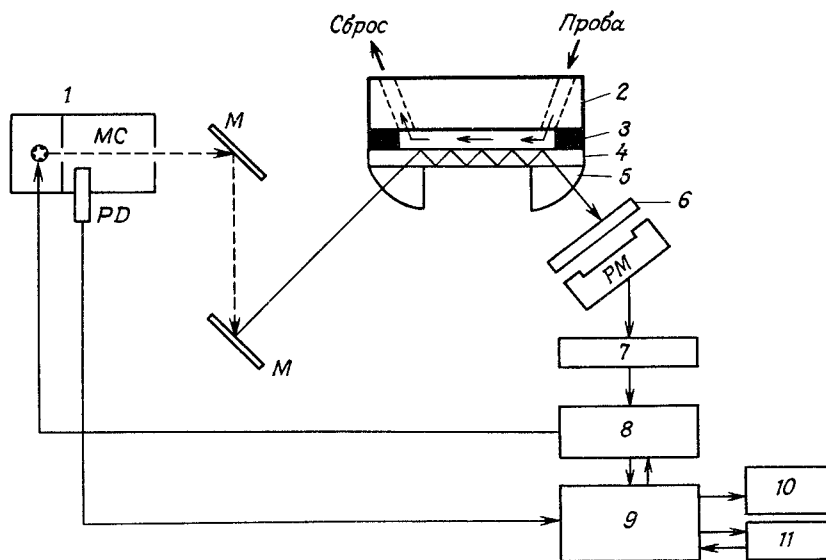


Рис. 33.6. Схема установки МНПВО с плоским волноводом для иммуноанализа. ФМ — вакуумный фотомножитель; PD — фотодиод; МС — монохроматор; М — зеркала; 1 — импульсная ксеноновая лампа; 2 — проточная ячейка; 3 — прокладка; 4 — волновод; 5 — призма; 6 — фильтр; 7 — предусилитель; 8 — управление импульсной лампой; 9 — компьютер Apple II; 10 — печатающее устройство; 11 — гибкий диск.

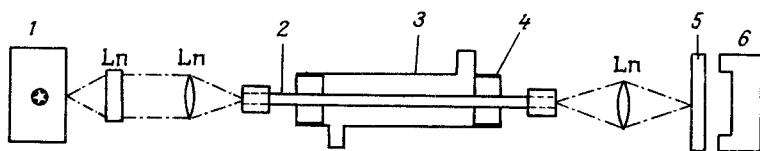


Рис. 33.7. Схема волоконно-оптической установки с проточной ячейкой и согласующей оптикой. Lп-линзы; 1-импульсная ксеноновая лампа; 2-оптическое волокно; 3-проточная ячейка; 4-силиконовая пробка; 5-фильтр; 6-детектор.

Весьма перспективным элементом многократного внутреннего отражения является оптическое волокно. В этом случае свет также вводится под углом, большим θ_c , и распространяется вдоль волокна благодаря полному внутреннему отражению. Оптические волокна, выпускаемые для систем связи, обладают отличными оптическими свойствами. Вследствие малого диаметра и (в принципе) неограниченной длины оптического волокна число отражений в таком волокне, используемом в качестве ЭВО, может быть очень большим. Чтобы поверхность волокна привести во взаимодействие с исследуемым образцом, с волокна заводского изготовления, предназначенного для системы связи, необходимо удалить защитную оболочку и покрытие. Это относительно легко сделать в случае покрытых пластиком кварцевых волокон (производимых, например, фирмой Fibre Optique Industries, Питивьерс, Франция) с диаметром сердцевины от 0,2 до 1,5 мм. На рис. 33.7 показана схема волоконно-оптической системы (с диаметром сердцевины 0,6 мм). В проточной цилиндрической ячейке вытянутую нить опускают в исследуемый раствор на участке длиной 64 мм. Концы волокна закреплены в металлических насадках и отполированы. Линзы задают апертурный угол около 70° .

Волокна других типов, например кварцевые волокна для систем связи (диаметры центральных жил 5–50 мкм), трудно использовать из-за их малого размера. Аналогично в случае длинных оптических волокон трудно рассчитать углы падения и соответственно эффективные толщины из-за усложнения оптических путей и режима преобразования света, связанного с изгибами волокон. Данные об использовании таких волокон в иммуноанализе отсутствуют.

33.3.2. Поверхностный плазмонный резонанс

Основные оптические компоненты систем для регистрации ППР сходны с компонентами, используемыми в спектроскопии НПВО (см. рис. 33.3 и 33.1,а). В качестве ЭВО здесь выступают призмы, с сенсорной стороны покрытые тонкой пленкой металла (например, Ag, Au, Al или Cu).

Для детектирования плазмонного резонанса используют несколько методов. Наиболее распространенным является измерение ослабленного отражения как функции угла падения при фиксированной длине волны или как функции длины волны при фиксированном угле падения. В первом случае можно измерять угловые сдвиги порядка $0,0005^\circ$ [11]. Во втором случае, измеряя интенсивность отраженного света при постоянном угле падения, соответствующем полувисоте минимума отражения, регистрируют изменения показателя преломления порядка $0,00001$ [27]. Еще один метод заключается в измерении интенсивности света, рассеянного вследствие шероховатости поверхности пленки, как функции угла падения при фиксированной длине волны. Геометрия системы в данном случае сходна с используемой при регистрации НПВОФ под прямым углом (см. рис. 33.1,з).

33.3.3. Требования к оптическим материалам

При выборе оптического материала для ЭВО необходимо принимать во внимание его оптические характеристики (показатель преломления, полоса пропускания, качество поверхности), механические свойства (твердость, хрупкость), химическую природу (инертность, адсорбционная способность белков, доступность химических групп для ковалентного связывания с белками).

Оптические и механические аспекты данной проблемы детально обсуждаются в работе [16], где приведены показатели преломления и полосы пропускания для ряда материалов в видимой, УФ-, ИК- и дальней ИК-области спектра. Противоположные поверхности ЭВО должны быть плоскими и параллельными, а их качество достаточно высоким, чтобы свести к минимуму световые потери, обуславливаемые рассеянием. Важно также, чтобы материал ЭВО был достаточно прочным и нехрупким, чтобы не возникало проблем с его обработкой при изготовлении ЭВО и особенно при подготовке поверхности.

Чаще всего ЭВО изготавливают из кварца, оптические и химические свойства которого хорошо изучены. Полоса пропускания кварца находится в диапазоне от 0,3 до 2,3 мкм, что позволяет проводить измерения в УФ-, видимой и ближней ИК-области. Кварц – довольно прочный материал, его относительно легко обрабатывать. В качестве вполне доступных кварцевых ЭВО можно использовать предметные стекла для микроскопов и жилы кварцевых волокон с пластиковым покрытием.

33.3.4. Иммобилизация антител

Ключевым фактором успешного развития СВО-приборов для иммуноанализа является иммобилизация одного из компонентов иммунохимической пары на поверхности ЭВО. Методика иммобилизации должна не только удовлетворять таким требованиям, как воспроизводимость, захват большого количества белка, сохранение иммунохимической активности и устойчивости, но и не вызывать химических или физических изменений на поверхности, которые могли бы приводить к нежелательным оптическим эффектам (например, рассеянию света). Поскольку в большинстве работ по данному вопросу использовали кварц или стекло, мы ограничимся обсуждением только этих материалов. Кроме того, в дальнейшем мы будем рассматривать только иммобилизацию белков. На поверхностях ЭВО можно иммобилизовать и многие антигены небелковой природы. Для этого используют химические реакции, пригодные лишь для определенных соединений, поэтому здесь мы их также не будем обсуждать. Отметим, однако, один из подходов к решению данной проблемы, состоящей в том, что на ЭВО наносят белок (например, бычий сывороточный альбумин), с которым затем связывают его небелковый антиген [24].

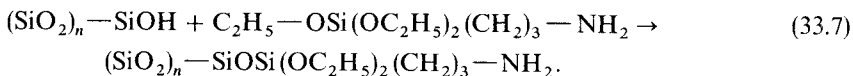
Наиболее распространенными методами иммобилизации белка на кварцевых или стеклянных поверхностях являются физическая адсорбция и ковалентное связывание. По данному вопросу имеется значительное количество информации (см., например, обзоры [20], [34], [53–55]) и для подробного ознакомления отсылаем читателя к этим обзорам, а в этой главе ограничимся рассмотрением общих принципов.

Физическая адсорбция белков на кремнийсодержащих поверхностях является, вероятно, результатом слабых взаимодействий, таких как заряд-зарядовое (например, ионное, образование солевых мостиков), или образования водородных связей [33]. Однако образуемые при адсорбции связи между белком и стеклом столь прочны, что для удаления белков требуются сильные кислоты или щелочи. Привлекательность физической адсорбции при создании ЭВО, покрытых антителами, обусловлена возможностью быстрой адсорбции белков на стеклянных поверхностях в одну стадию. Кроме

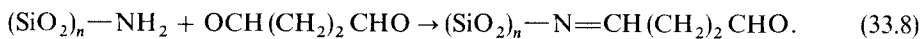
того, адсорбция не приводит к изменению оптических характеристик стекла. Типичная методика иммобилизации антител на стекле или кварце заключается в следующем. Сначала поверхность очищают, используя сильные кислоты, детергенты, органические растворители или комбинации этих реагентов, а также физические методы (например, нагревание до высоких температур или ионную бомбардировку [5, 48]). Далее поверхность гидрофобизируют (например, окуная ЭВО в дихлорметилсилан [12]), что способствует адсорбции белка. Затем ЭВО погружают на несколько часов в раствор соответствующего белка, промывают, чтобы удалить несвязанный белок, инкубируют в растворе неспецифического белка для блокировки незаполненных центров связывания, опять промывают и до использования хранят в сухом виде при 4 °С.

Адсорбция белков на поверхностях твердых тел—это сложный и, вообще говоря, плохо изученный процесс [30]. Поэтому и получение волноводов, покрытых антителами, базируется на эмпирическом методе проб и ошибок. Кроме того, используя этот метод, трудно предсказать конфигурацию белков на поверхности и влияние самой адсорбции на доступность центров связывания антител для антигенов. В этом смысле ковалентное связывание более привлекательно, поскольку в принципе оно позволяет контролировать процесс иммобилизации и до определенной степени предсказывать результат.

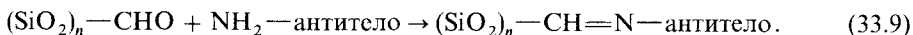
Большинство работ по ковалентному связыванию белков с кремнийсодержащими поверхностями выполнено на стеклянных частицах с контролируемыми размерами пор [31]. Наиболее распространенным и, вероятно, простейшим методом является реакция белка с силановыми связывающими агентами. Эти агенты представляют собой мономерные силаны, имеющие на одном конце органические функциональные группы, а на другом—группы, реагирующие с неорганической поверхностью. Типичным таким агентом является γ -аминопропилтриэтоксисилан (АПТС), который можно использовать для присоединения белка к кремнийсодержащей поверхности с помощью следующей трехстадийной процедуры. В кислых водных растворах эфирные группы АПТС гидролизуются с образованием гидроксидов, которые могут затем взаимодействовать с поверхностными силанольными группами. В результате получается поверхность с боковыми цепями, содержащими аминогруппу:



На второй стадии аминогруппы используют для получения активного промежуточного соединения—альдегида—по реакции с глутаровым альдегидом в нейтральной среде:



Последняя стадия заключается в реакции альдегидной группы с первичным амином белка с образованием иминной связи:



Этот метод используют для иммобилизации антител на плоских кварцевых ЭВО и оптических волокнах [46, 47]. В нем, однако, имеется ряд подводных камней. В частности, оптимальные концентрации активных альдегидных групп на поверхности попадают в довольно узкий диапазон. Для получения устойчивого слоя антител на поверхности ЭВО требуется, чтобы число таких групп было минимальным—если их слишком много, это может приводить к многоточечному связыванию антител на поверхности и падению их иммунохимической активности. Кроме того, толщина силанового слоя зависит от многих факторов, включая pH, температуру, продолжительность химической реакции, удельную поверхность, концентрацию силана и приро-

ду растворителя [44]. Чтобы добиться воспроизводимости при оптимизации условий иммобилизации антител, необходимо учитывать все эти факторы.

В устройствах для СВО используют и ряд других систем с ковалентным связыванием [36]. Так, иммобилизацию белка на поверхности кремниевых пластинок проводят следующим образом. Кремниевые пластинки алкилируют, после чего образованные на алкилированной поверхности гидроксильные группы активируют трезилхлоридом. Трезилатные группы могут затем реагировать с аминогруппами белка. Этот метод применяли для закрепления на кремниевых поверхностях конканавалина А, который в дальнейшем реагировал с клетками *S. aureus*. Взаимодействие клеток с поверхностью контролировали с помощью эллипсометрии [32].

33.4. Применение СВО-приборов в иммуноанализе

33.4.1. Нарушенное полное внутреннее отражение

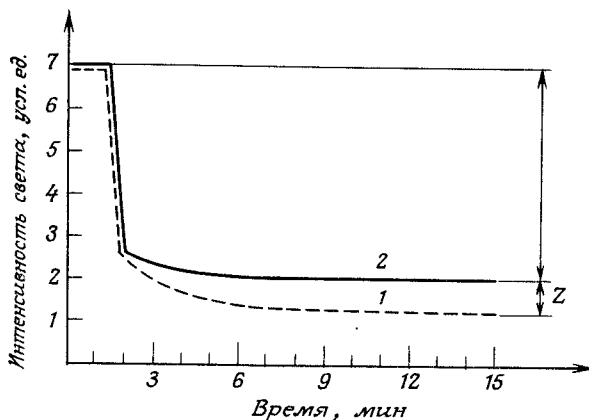
В иммуноанализе используют спектроскопию НПВО в ИК-, видимой и УФ-областях спектра. Как уже отмечалось выше при рассмотрении принципов НПВО, захват антигена (или антитела) на границе раздела волновод/жидкость регистрируется как ослабление светового пучка при внутреннем отражении. Это ослабление зависит от положения максимума поглощения одного из компонентов иммунохимической пары.

В работе [38] НПВО использовали для мониторинга в ИК-области реакций между различными сывороточными альбуминами и соответствующими антисыворотками на границе раздела германий/раствор. Сначала поверхность волновода погружали в раствор антигена и регистрировали спектр пропускания адсорбированного белкового слоя. В последующей реакции с разбавленным раствором антисыворотки связывание антител идентифицировали по уменьшению пропускания света в области, характерной для амидогрупп (1650 см^{-1}). При специфическом связывании, т.е. при протекании реакции антитело-антиген, изменение оптической плотности составляло 0,032, а при неспецифическом связывании (в отсутствие антигена) — только 0,007.

Хотя рассмотренный подход оказался вполне успешным, в нем все же далеко не полностью реализуются потенциальные возможности методов СВО, которые в принципе позволяют непрерывно контролировать иммунохимические реакции как в видимой, так и в УФ-области.

В качестве модельной системы для мониторинга методом НПВО использовали реакцию между гемоглобином и антигемоглобиновой антисывороткой кролика (Sutherland R. M., Kulhanek E., Dahne C., неопубликованные данные). В этом случае антитела кролика, ковалентно иммобилизованные на поверхности кварцевого предметного стекла, реагировали с растворами гемоглобина разной концентрации. Измеряя ослабление отраженного света на длине волны 410 нм (максимум поглощения гемоглобина), получили кривую изменения интенсивности сигнала во времени, на которой можно выделить три участка (рис. 33.8). Исходную базовую линию устанавливали по физиологическому раствору, содержащему овечью сыворотку (чтобы минимизировать неспецифическое связывание гемоглобина с поверхностью). При введении в систему раствора антигена пропускание резко падает вследствие поглощения света молекулами гемоглобина, диффундирующими на глубину проникновения затухающей волны. Затем следует быстрое ослабление пропускания по мере связывания молекул гемоглобина с антителами вблизи поверхности. Наконец, когда центры связывания антител насыщаются, скорость изменения пропускания снижается. На рис. 33.8 показаны также результаты повторных опытов с вытеснением антител с поверхности пластинки бычьим сывороточным альбумином. Разница между двумя кривыми характеризует специфическое связывание гемоглобина с поверхностью.

Рис. 33.8. Взаимодействие гемоглобина с антигемоглобином кролика (кодový номер A118, фирма Dako Immunglobulins, Копенгаген, Дания), присоединенным к поверхности элемента многократного отражения с помощью ковалентных связей (сшивание аминокпропилтриэтоксисилоном; подробности см. в тексте) (1), и бычьим сывороточным альбумином, иммобилизованным аналогично на втором ЭВО (2). В проточную ячейку, изображенную на рис. 33.6, вводили раствор гемоглобина концентрации 10 мг/мл. За реакцией следили по ослаблению внутренне отраженного пучка света с длиной волны 410 нм. Разность между двумя кривыми (Z) характеризует специфическое связывание (Sutherland R.M., Kulhanek E., Dahne C., неопубликованные данные).



Аналогичные результаты были получены в работе [46], в которой за специфическим связыванием хемотерапевтического средства метотрексата с антителами, иммобилизованными на границе раздела кварц/раствор, следили по ослаблению пропускания в УФ-области при 310 нм. Измеряя абсолютные величины или скорости изменения пропускания, строили кривую сигнал-доза. Найденный по этой кривой предел обнаружения метотрексата этим методом составляет 0,3 мкмоль/л.

33.4.2. Нарушенное полное внутреннее отражение с флуоресценцией

Впервые НПВОФ использовали для изучения иммунохимических реакций в работах [23–25]. На поверхности кварцевого предметного стекла через гаптен-альбуминовые конъюгаты иммобилизовали такие гаптены, как фениларсоновая кислота или морфин. Связанные с гаптенами FITC-меченные антитела детектировали по флуоресценции, возбуждаемой затухающей волной. При добавлении свободного гаптена в раствор скорость связывания FITC-антител с поверхностью уменьшалась в зависимости от концентрации гаптена. При регистрации флуоресценции под прямым углом (рис. 33.1, в) предел обнаружения морфина составлял 0,2 мкмоль/л.

В работе [48] обсуждаемый метод использовали в комбинации с флуоресцентной корреляционной спектроскопией. На кварцевой пластинке при помощи адсорбированного альбумина иммобилизовали динитрофенол. Затем исследовали реакцию связанного с поверхностью гаптена с мечеными родамином одно- и двухвалентными антителами. Один из основных выводов из этих экспериментов — наличие на поверхности большого количества неспецифически связанного антитела (им обуславливается до 60% сигнала). По заключению автора [48], высокий уровень неспецифического связывания не позволяет непрерывно контролировать кинетику связывания.

Используя FITC в качестве метки, авторы [47] исследовали реакцию между IgG человека и двумя антисыворотками с целью выявить факторы, с помощью которых можно было бы устранять неспецифическое связывание в системе НПВОФ. Предварительные опыты показали, что добавление в буферный раствор избытка (200-кратного по отношению к антителам) подходящей неиммунной животной сыворотки снижает неспецифическое связывание FITC-меченного белка до приемлемого уровня. Вероятно, на поверхности волновода неиммунная сыворотка конкурирует с белками за неспецифически связывающие центры и насыщает их. Таким образом, в данной системе имеет

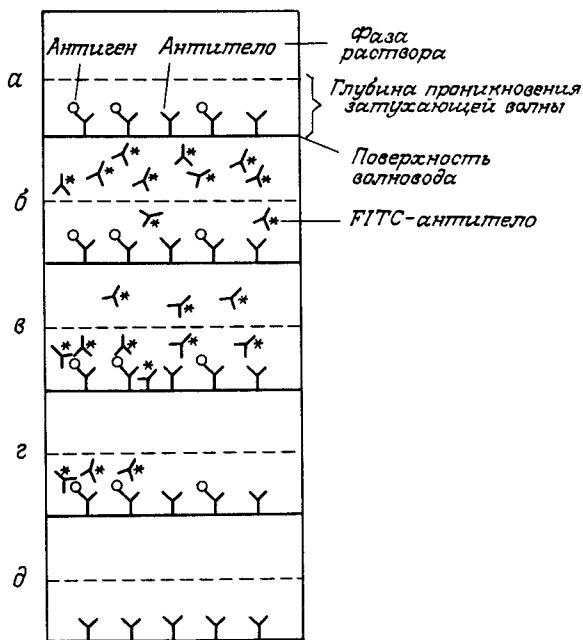
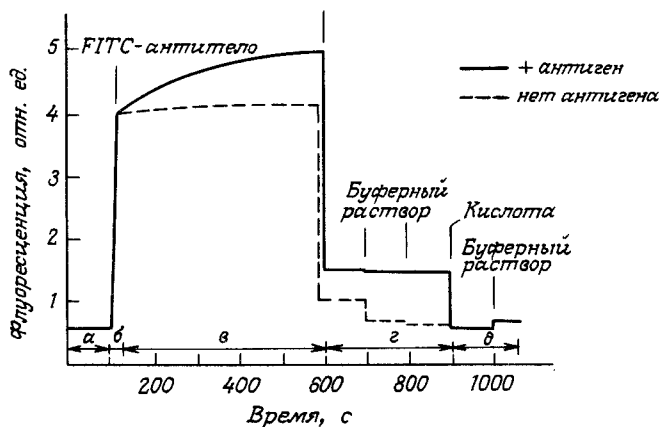
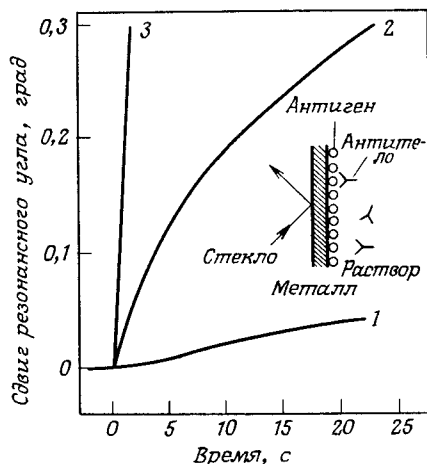


Рис. 33.9. Кривые связывания и схема двухсайтного иммунофлуоресцентного анализа с использованием НПВОФ. Поверхность ЭВО покрывают антителами к IgG человека и приводят в контакт со стандартным раствором IgG концентрацией 10 мг/мл. Имобилизованные таким способом антигены затем реагируют с FITC-мечеными анти-IgG. Реакцию контролируют, измеряя интенсивность флуоресценции либо под прямым углом [47], либо по ходу отраженного луча [46]. а: подготовленный к работе ЭВО; б: сигнал, генерируемый несвязанным FITC-анти-IgG в области проникновения затухающей волны (т.е. в слое толщиной d_p); в: кривые связывания FITC-анти-IgG в присутствии (сплошная линия) и в отсутствие (штрихпунктир) антигена; г: после промывки несвязанные компоненты удаляются и остаются сигналы специфически (сплошная линия) и неспецифически связанного (штрихпунктир) FITC-анти-IgG; д: разрушение иммунохимических комплексов разбавленной кислотой.

место конкурентное ингибирование неспецифического взаимодействия между белками с флуоресцирующей меткой и иммобилизованными антителами.

В буферных системах, содержащих животные сыворотки, проводили также опыты, целью которых отчасти была оптимизация иммунофлуориметрического метода определения IgG. На поверхности волновода ковалентно иммобилизовали анти-IgG овцы, которые затем реагировали со стандартным раствором IgG человека. Чтобы удалить несвязанные иммуноглобулины, поверхность промывали буферным раствором. Затем с помощью НПВОФ (с регистрацией под прямым углом) контролировали реакцию между иммунохимически иммобилизованными IgG и вторым (FITC-меченым) антителом кролика. На рис. 33.9 приведен вид сигнала, генерируемого при использовании

Рис. 33.10. Сдвиг резонансного угла во времени при трех различных концентрациях анти-IgG; концентрация IgG 2 (1), 20 (2) и 200 мкг/мл (3). Сдвиг измеряли по увеличению интенсивности отраженного света. На врезке показана схема связывания антител.



данной методики, и интерпретация различных его участков. Предел обнаружения в этой системе приблизительно 5 мкг/мл.

Рассмотренные системы НПВОФ базируются на детектировании флуоресцентного сигнала под прямым углом. Можно использовать и детектирование по ходу отраженного пучка (рис. 33.1,з). Для детектирования сигнала в этом режиме в работах [8, 46] использовали как кварцевые пластинки, так и кварцевые оптические волокна. Для иммунофлуоресцентного анализа по двухцентральной реакции предел обнаружения IgG после десятиминутной инкубации с FITC-антителами достигает 3,0 и 1,5 мкг/мл для плоских и волоконных волноводов соответственно.

33.4.3. Поверхностный плазмонный резонанс

Авторы [37] первыми предложили использовать ППР в качестве способа контроля иммунохимических реакций и малых изменений толщины иммунохимических слоев (примерно 30 Å). В одной из последних работ в данной области в качестве модельной реакции исследовали взаимодействие между IgG человека и анти-IgG. Антиген адсорбировался на посеребренной поверхности призмы, образуя слой толщиной до 50 Å [27]. Затем адсорбированный белок выдерживали в растворах с различной концентрацией IgG и следили за сдвигом резонансного угла при фиксированной длине волны (рис. 33.10). При выдержке в течение 25 с чувствительность этого метода к антителам такова, что позволяет различать концентрации 0,2 и 2 мкг/мл.

Аналогичные опыты проводили также, используя сывороточный альбумин человека как антиген [13]. Исходная толщина слоя антигена была равна 60 Å. После реакции с антителами она возрастала до 200 Å, что соответствует примерно четырем слоям IgG. Авторы [13] полагают, что в верхних слоях часть антител адсорбируется неспецифически, хотя одной из причин связывания может быть кооперативное взаимодействие между молекулами иммуноглобулина.

33.5. Обсуждение

Потенциальные преимущества СВО в иммуноанализе обуславливаются возможностью следить за поверхностными реакциями без существенных помех со стороны компонентов в объеме раствора. Приведенные выше примеры демонстрируют гиб-

кость данной концепции. Однако требуются еще значительные усилия, прежде чем потенциал этих систем будет реализован как в исследовательских, так и в коммерческих разработках. Для успешного применения СВО-устройств в иммуноанализе существенны два фактора. Во-первых, как реагенты антитела позволяют специфически определять какое-либо соединение (или ряд родственных соединений) в сложных смесях, каковыми являются клинические препараты (например, сыворотка, плазма или цельная кровь). Проводятся обширные исследования по адаптации этих методов к обычному иммуноанализу, конечно, не в ущерб его специфичности. Однако СВО-устройства могут создавать некоторые новые (да и уже известные) трудности. Во всех трех рассмотренных случаях, НПВО, НПВОФ и ППР, системы чувствительны к неспецифическим оптическим и/или физическим взаимодействиям на границе раздела фаз. В первых двух случаях это чувствительность к веществам, создающим оптические помехи на расстояниях в пределах глубины проникновения затухающей волны (т. е. к веществам, которые поглощают при той же длине волны или же тушат флуоресценцию). Для всех трех методов, особенно для ППР, характерна чувствительность к неспецифическому физическому связыванию на границе раздела. Поскольку ППР фактически определяется эффективной толщиной слоя и показателем преломления, неспецифические изменения любого из этих параметров могут затруднять выделение эффектов специфического связывания.

Во-вторых, обычные, т. е. гетерогенные, методы иммуноанализа, включающие стадию разделения, весьма чувствительны и при использовании радиоактивных меток позволяют определять фемтомольные количества иммуноактивных соединений. В то же время по имеющимся данным при использовании НПВО, НПВОФ и ППР пределы обнаружения составляют приблизительно 1 мкмоль/л, 10 нмоль/л и < 5 нмоль/л соответственно. Таким образом, эти методы должны быть существенно усовершенствованы, с тем чтобы их чувствительность приблизилась к чувствительности обычных гетерогенных методов иммуноанализа.

Одним из ключевых элементов повышения чувствительности СВО-систем является использование многократного внутреннего отражения, как это уже делается в системах НПВО и НПВОФ. Применение более тонких и/или длинных волноводов дает выигрыш

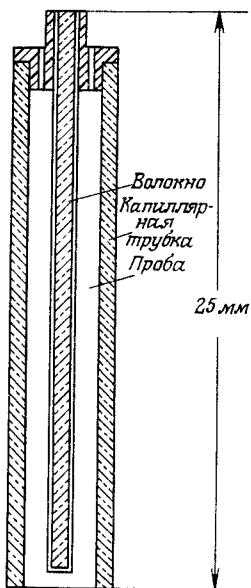


Рис. 33.11. Волоконно-оптический элемент внутреннего отражения одnorазового пользования для иммуноанализа на основе НПВОФ. Волокно помещено в капиллярную трубку, что упрощает отбор пробы. Раствор засасывается в кювету под действием капиллярных сил, причем объем пробы точно определяется объемом капиллярной трубки. (С разрешения автора [19].)

в чувствительности, которая растет при этом как x^N , где N — число отражений (см. уравнение (33.6)). В этом смысле значительные преимущества имеют оптические волокна, поскольку их можно делать очень тонкими, и при соответствующей оптической системе детектирования сенсорным элементом является вся их внешняя поверхность. На рис. 33.11 показана конструкция диагностического волоконно-оптического устройства одноразового пользования. Однако производство такого прибора может быть сопряжено с серьезными проблемами.

Если рассматриваемые методы обеспечивают необходимую чувствительность при разумной продолжительности анализа (минуты, а не часы), то такие СВО-устройства на основе оптических волокон могут найти применение для измерений как *in vivo*, так и *in vitro*. Оптические волокна успешно используют в хирургии, при оптических обследованиях (например эндоскопии) и для различных анализов *in vivo* (например, для определения давления кислорода в крови, степени ее оксигенации, pH). Это обуславливается как их малыми размерами и гибкостью, так и светопроводящими свойствами. При использовании СВО-устройств для анализа *in vivo* не менее важны могут быть и другие характеристики, такие как химическая инертность, возможность изготовления из биосовместимых материалов. Стоимость изготовления таких устройств должна быть достаточно низкой, чтобы их можно было делать одноразовыми. При этом, однако, возникают еще две важные проблемы. Во-первых, как стерилизовать устройство одноразового пользования без разрушения антител? Во-вторых, как использовать это устройство для непрерывного контроля? Последняя проблема обусловлена тем, что из-за высокой константы сродства антитела связываются с антигенами практически необратимо и, таким образом, сенсор не может быстро реагировать на изменение (уменьшение) концентрации антигена.

Одной из целей применения СВО-устройств в оптических методах иммуноанализа должно быть создание более простых тестовых систем для клинической диагностики. Поскольку стадия разделения отсутствует, такие аналитические системы могут обслуживаться относительно неквалифицированным персоналом. Для создания таких приборов необходима не только разработка соответствующих СВО-устройств, но и простой фотометрической измерительной системы. Пока такие системы еще труднодоступны.

В заключение еще раз отметим, что СВО-устройства имеют большие возможности для приложения как в исследовательских, так и в коммерческих целях, поскольку по сравнению с обычными методами иммуноанализа они обеспечивают относительно большую гибкость и простоту. Дальнейшее развитие этой области может привести к появлению на рынке множества новых приборов для диагностики *in vitro* и даже *in vivo*.

Благодарности

Авторы выражают признательность А. Бреггарду за техническую помощь при разработке волоконно-оптической системы, А. Рингросу за большой вклад в конструирование используемой в лаборатории системы с плоским волноводом, а также м-с Е. Кулханек за работу с описанной выше гемоглобиновой системой. Мы благодарны также секретариату Battelle Institute за перепечатку этой рукописи в сжатые сроки и особенно м-с Дж. Бё за чтение корректуры. Описанные выше работы частично финансировались фирмой Prutec Ltd.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amzel L. M., Poljak R. J. Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Ann. Rev. Biochem.*, **48**, 961-98 (1979).
2. Azzam R. M. A., Bashara N. M. Ellipsometry and polarized light. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1977.

3. *Baier R.E., Dutton R.C.* Initial events in interaction of blood with a foreign surface. *J. Biomed. Mater. Res.*, **3**, 191-206 (1969).
4. *Brash I.L., Lyman D.J.* Adsorption of proteins and lipids to nonbiological surfaces. In *The chemistry of biosurfaces* (ed. M.L. Hair), pp. 177-232. Marcel Dekker Inc., New York, 1971.
5. *Burghardt T.P., Axelrod D.* Total internal reflection/fluorescence photobleaching recovery study of serum albumin adsorption dynamics. *Biophys. J.*, **33**, 455-68 (1981).
6. *Carniglia C.K., Mandel L., Drexhage H.* Absorption and emission of evanescent photons. *J. Opt. Soc. Amer.*, **62**, 479-86 (1972).
7. *Carter T., Dähne C., Place J.F.* European Patent Application EP 81-801255.0, 1982.
8. *Dähne C., Sutherland R.M., Place J.F., Ringrose A.R.* Detection of antibody-antigen reactions at a glass-liquid interface: a novel fibre-optic sensor concept. In *OFS '84, Proceedings of the second international conference on optical fibre sensors* (eds. R.T. Kersten, R. Kist), pp. 75-9. VDE-Verlag, Berlin, 1984.
9. *Dandliker W.B., Hsu M.-L., Vanderlaan W.P.* Fluorescence polarization immuno/receptor assays. In *Immunoassays, clinical laboratory techniques for the 1980's* (eds. R.M. Nakamura, W.R. Dito, E.S. Tucker), pp. 65-88. Alan R. Liss Inc., New York, 1980.
10. *Deaton C.D., Maxwell K.W., Smith R.S., Creveling R.L.* The use of laser nephelometry in the measurement of serum proteins. *Clin. Chem.*, **22**, 1465-70 (1976).
11. *Eagen C.F., Weber W.H.* Modulated surface-plasmon resonance for adsorption studies. *Phys. Rev.*, **19**, 5068-82 (1979).
12. *Elwing H., Stenberg M.* Biospecific bimolecular binding reactions—a new ellipsometric method for their detection, quantitation and characterization. *J. Immunol. Methods*, **44**, 343-9 (1981).
13. *Flanagan M.T., Pantell R.M.* Surface plasmon resonance and immunosensors. *Electr. Lett.*, **20**, 968-70 (1984).
14. *Gendreau R.M., Winters S., Leininger R.I., Fink D., Hassler C.R., Jakobsen R.J.* Fourier-transform infrared spectroscopy of protein adsorption from whole blood: Ex-vivo dog studies. *App. Spectr.*, **35**, 355-7 (1981).
15. *Gendreau R.M., Leininger R.I., Winters S., Jakobsen R.J.* Fourier-transform infrared spectroscopy for protein-surface studies. In *Biomaterials: Interfacial phenomena and applications* (eds. S.L. Cooper, N.A. Peppas). *Adv. Chem. Ser.* **199**, 371-95 (1982).
16. *Harrick N.J.* Internal reflection spectroscopy. Interscience, New York, 1967.
17. *Harrick N.J., Loeb G.I.* Multiple internal reflection spectrometry. *Anal. Chem.*, **45**, 687-91 (1973).
18. *Hauge P.S.* Recent developments in instrumentation in ellipsometry. *Surf. Sci.*, **96**, 108-40 (1980).
19. *Hirschfeld T.E.* US Pat. 4,447,546, 1984.
20. Affinity techniques. *Jakoby W.B., Wilchek M.* (eds.). *Methods in enzymology*. Vol. 34, Academic Press, New York, 1974.
21. *Kirkham K.E., Hunter W.M.* Radioimmunoassay methods. Churchill-Livingstone, Edinburgh, 1971.
22. *Kretschmann E., Raether H.* Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. *Naturforschung*, **123**, 2135-6 (1968).
23. *Kronick M.N., Little W.A.* A new fluorescent immunoassay. *Bull. Amer. Phys. Soc.*, **18**, 782 (1973).
24. *Kronick M.N., Little W.A.* A new immunoassay based on fluorescence excitation by internal reflection spectroscopy. *J. Immunol. Methods*, **8**, 235-42 (1975).
25. *Kronick M.N.* US Pat. No. 3,939,350, 1976.
26. *Lee E.H., Benner R.E., Fenn J.B., Chang R.K.* Angular distribution of fluorescence from liquids and monodispersed spheres by evanescent wave excitation. *App. Opt.*, **18**, 862-70 (1979).
27. *Liedberg B., Nylander C., Lundström I.* Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sens. Act.*, **4**, 299-304 (1983).
28. *Lok B.K., Cheng Y.-L., Robertson C.R.* Protein adsorption on cross-linked polydimethylsiloxane using total reflection fluorescence. *J. Coll. Interf. Sci.*, **91**, 104-116 (1983).
29. *Lok B.K.* Total internal reflection fluorescence: A technique for examining interaction of macromolecules with solid surfaces. *Ibid.*, 87-103 (1983).
30. *Lundström I.* Surface physics and biological phenomena. *Phys. Scrip.*, **T4**, 5-13 (1983).
31. *Lynn M.* Inorganic support intermediates: covalent coupling of enzymes on inorganic supports. In *Immobilized enzyme, antigens, antibodies and peptides* (ed. H.H. Weetall), pp. 1-48. Marcel Dekker Inc., New York, 1975.
32. *Mandenius C.F., Welin S., Danielsson B., Lundström I., Mosbach K.* The interaction of proteins and cells with affinity ligands covalently coupled to silicon surfaces as monitored by ellipsometry. *Anal. Biochem.*, **137**, 106-14 (1984).
33. *Messing R.A.* Adsorption and inorganic bridge formation. In *Immobilized enzymes* (ed. Mosbach K.). *Methods in enzymology*. Vol. 64, pp. 148-169. Academic Press, New York, 1976.
34. *Immobilized enzymes*. Mosbach K. (ed.). *Methods in enzymology*. Vol. 64. Academic Press, New York, 1976.
35. *Muller R.H.* Present state of automatic ellipsometers. *Surf. Sci.*, **56**, 19-36 (1976).

36. Nilsson K., Mosbach K. Immobilization of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports using highly reactive sulfonyl chlorides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **102**, 449-57 (1981).
37. Nylander C., Liedberg B., Lund T. Gas detection by means of surface plasmon resonance. *Sens. Actuators*, **3**, 79-88 (1982).
38. Ockman N. The antibody-antigen interaction at an aqueous-solid interface: a study by means of polarized infrared ATR spectroscopy. *Biopolymers*, **17**, 1273-84 (1978).
39. Pockrand I., Swalen J. D., Gordon I., Philpott M. R. Surface plasmon spectroscopy of organic monolayer assemblies. *Surf. Sci.*, **74**, 237-44 (1977).
40. Poste G., Moss C. Antigen-antibody reactions in thin films. In *The study of surface reactions in biological systems by ellipsometry* (eds. G. Poste, C. Moss), pp. 206-231. Pergamon Press, New York, 1972.
41. Raether H. Surface plasmon oscillations and their applications. In *Physics of thin films, advances in research and development* (eds. G. Haas, M. H. Francombe). Vol. 9, pp. 145-261. Academic Press, New York, 1977.
42. Raether H. Excitation of plasmons and interband transition by electrons. Springer, tracts in modern physics. Vol. 88. Springer-Verlag, Berlin, FRG, 1980.
43. Rothen A. Ellipsometric studies of thin films. In *Progress in surface and membrane science* (eds. J. F. Danielli, M. D. Rosenberg), pp. 81-118. Academic Press, New York, 1974.
44. Schroder M. E., Lerner I., D'Oria F. J. Radioisotope study of coupling agents in reinforced plastics. *Med. Plast.*, **45**, 195-7 (1967).
45. Soini E., Hemmilä I. Fluoroimmunoassay: Present status and key problems. *Clin. Chem.*, **25**, 353-61 (1979).
46. Sutherland R. M., Dähne C., Place J. F., Ringrose A. R. Optical detection of antibody-antigen reactions at a glass liquid interface. *Clin. Chem.*, **30**, 1533-8 (1984).
47. Sutherland R. M. Immunoassays at a quartz-liquid interface: theory, instrumentation and preliminary application to the fluorescent immunoassay of human immunoglobulin G. *J. Immun. Methods*, **74**, 253-65 (1984).
48. Thompson N. L. Ph.D. Thesis. University of Michigan, 1982.
49. Thompson N. L., Burghardt T. P., Axelrod D. Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery and correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, **33**, 435-54 (1981).
50. Van Wagenen R. A., Rockhold S., Andrade J. D. Probing protein adsorption: total internal reflection intrinsic fluorescence. In *Biomaterials. Interfacial phenomena and applications* (eds. S. L. Cooper, N. A. Peppas). *Adv. Chem. Ser.* Vol. 199, pp. 351-370 (1982).
51. Van Wagenen R. A., Zdasiuk B. J., Andrade J. D. Total internal reflection fluorescence studies of albumin adsorption onto quartz. *Org. Coat. Plast. Chem.*, **42**, 749-53 (1980).
52. Watkins R. W., Robertson C. R. A total internal reflection technique for the examination of protein adsorption. *J. Biomed. Mater. Res.*, **11**, 915-38 (1977).
53. Weetall H. H. Insolubilized antigens and antibodies. *The chemistry of biosurfaces* (ed. M. L. Hair). Vol. 2, pp. 597-631. Marcel Dekker, New York, 1972.
54. Weetall H. H. Preparation, characterization and application of enzymes immobilized on inorganic supports. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **42**, 191-2 (1974).
55. Immobilized enzymes, antigens, antibodies and peptides: Preparation and characterization. Weetall H. H. (ed.). Marcel Dekker, New York, 1975.

Глава 34

Рассеяние лазерного света и связанные с ним методы

*Роберт Дж. Г. Карр, Роберт Г. У. Браун, Джон Г. Рэрти,
Дэвид Дж. Кларк*

34. 1. Введение

Оптические методы занимают центральное место в анализе биологических систем и используются в самых разных вариантах. В последние годы изобретение лазера стимулировало развитие новых и совершенствование старых оптических измерительных систем. С момента появления — а в 1985 г. праздновалось 25-летие его открытия — лазер вносит существенный вклад в методологию измерений не только в лабораториях, но и в промышленности.

Лазер как источник света обладает уникальными свойствами. Он излучает коллимированный монохроматический свет, диапазон которого простирается от рентгеновских лучей до микроволн (мазеры), проходя через ультрафиолетовую, видимую и инфракрасную области электромагнитного спектра. Световое излучение может быть непрерывным или импульсным, причем импульсы могут быть весьма короткими, до нескольких фемтосекунд ($\sim 1 \cdot 10^{-15}$ с), а выходная мощность находится в диапазоне от микроватт до мегаватт и более. Испускаемый лазером свет может быть высокополяризованным (электрическое поле осциллирует только в одном направлении) и обычно является когерентным как во времени, так и в пространстве (полевые фазовые соотношения неизменны как вдоль, так и поперек пучка). Существует обширная литература по типам лазеров, их свойствам и применениям, в том числе множество вводных курсов [15, 18, 47, 75].

Лазерное излучение существенно отличается от белого света, испускаемого обычными источниками. Свойства этого излучения можно с высокой эффективностью использовать в оптических измерительных системах.

Вместе с лазерами интенсивно развивается волоконно-оптическая техника [25], причем основным стимулом здесь является быстрое расширение производства оптических систем коммуникации. Именно комбинация лазерной и волоконно-оптической технологий является предпосылкой разработки нового поколения оптических сенсоров, которые позволяют применять многие существующие оптические методы в ситуациях, ранее считавшихся неприемлемыми или неподходящими для оптических методов анализа или контроля.

Оптические волоконные сенсоры в принципе можно разделить на две большие группы: внутренние и внешние сенсоры [30]. К внутренним относятся сенсоры, в которых время прохождения (либо групповая или фазовая скорость), интенсивность или поляризация света, распространяющегося вдоль волокна, могут модулироваться действующей на волокно внешней силой. Разработаны внутренние сенсоры, чувствительные к изменению самых разнообразных физических переменных, например параметров электрических, магнитных и акустических полей, температуры, давления, напряжения и деформации, дозы радиации [14, 36, 49, 69]. Во внешних сенсорах волокно используют прежде всего как средство передачи света к чувствительному к определяемому веществу элементу, где свойства света (интенсивность, поляризация

или длина волны) модифицируются, а затем для отвода модифицированного света из измерительного элемента.

Волоконные сенсоры эффективно используют для определения все большего числа веществ в биологических системах как *in vitro* [68], так и *in vivo* [106], модифицируя оболочку волокна или его торец аналитическими реагентами или биомолекулами, чувствительными к определенному веществу. Интерес к развитию таких дистанционных волоконно-оптических сенсоров в значительной мере определяется такими их достоинствами, как миниатюрность, нечувствительность к электромагнитным воздействиям, прочность, гибкость, легкость манипулирования, долговечность и возможность их многократного использования [22, 28, 29]. С волоконно-оптической технологией сочетается множество оптических методов, в том числе основанных на рассеянии света частицами.

Рассеяние света давно является способом получения информации о размере, форме и составе частиц, однако в последние годы разработаны новые более мощные методы анализа, основанные на рассеянии лазерного света, которые, вероятно, найдут применение в волоконно-оптических сенсорах. В этой главе мы рассмотрим механизмы рассеяния лазерного света частицами (размером от макромолекул до микроорганизмов и более крупными), использование этого явления для изучения размеров частиц, их формы и скорости движения, других потенциально полезных для биотехнолога параметров и затем обсудим, как эти методы могут быть воплощены в биосенсорах.

34.2. Основы теории рассеяния света

Лазерный пучок обладает рядом параметров, которые могут быть весьма постоянны во времени, а при взаимодействии с различными типами материалов легко и специфично меняются, причем такая модификация поддается весьма точному анализу. Некоторые из этих параметров упоминались во введении. К ним относятся интенсивность, монохроматичность, фаза, поляризация и т. д. Достоинства лазера связаны с тем, что эти параметры воспроизводятся с погрешностью нередко менее 1%, а сам лазерный контроль является неразрушающим (т. е. без возмущения и загрязнения исследуемой системы).

Рассеяние света малыми частицами является предметом интенсивного исследования уже более 100 лет, по этому вопросу имеются хорошие обзоры и обширная литература (см., например, [37, 55, 60, 101]). При разработке биосенсоров приходится иметь дело прежде всего с тремя взаимосвязанными типами рассеяния света частицами определенных размеров: рэлеевское рассеяние, рассеяние Рэлея–Ганса–Дебая (РГД) и рассеяние Ми.

34.2.1. Рэлеевское рассеяние

Рассмотрим частицу диэлектрического (не поглощающего) материала, освещенную коллимированным плоскополяризованным светом с длиной волны много большей, чем максимальный размер частицы.

Падающий свет индуцирует в частице флуктуирующий дипольный момент, при этом частица выступает как точечный источник, одинаково излучающий по всем направлениям, перпендикулярным оси диполя. Интенсивность (I) света, рассеянного частицей в этой плоскости, обратно пропорциональна четвертой степени длины волны λ и прямо пропорциональна объему частицы V :

$$I \propto \frac{V^2}{\lambda^4}.$$

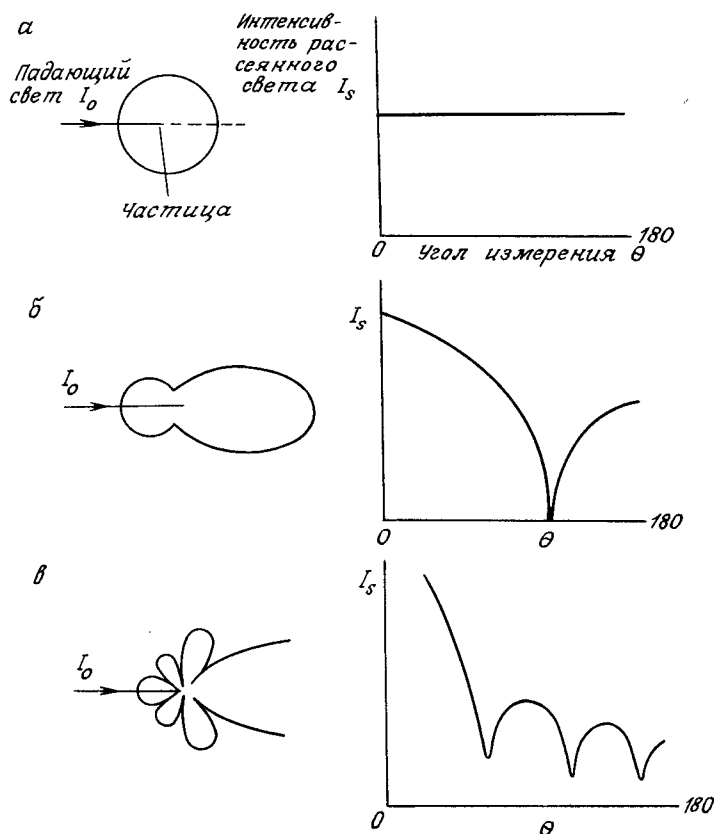


Рис. 34.1. Рассеяние света частицами по теории Рэлея (а), Рэлея–Ганса–Дебая (б) и Ми (в). Для всех типов рассеивающих частиц рассеяние света в плоскости, перпендикулярной плоскости поляризации падающего света (I_0), описывается графиком зависимости интенсивности рассеянного света I_s от угла измерения θ и соответствующими диаграммами рассеяния в полярных координатах (изменение интенсивности рассеянного света в круге $\pm 180^\circ$ для симметричной частицы).

В плоскости, параллельной индуцированному диполью (т. е. параллельной плоскости поляризации падающего света), интенсивность рассеянного света падает до нуля при угле, равном 90° (продольные волны в электромагнитном излучении отсутствуют). Диаграмма рассеяния в полярных координатах схематически показана на рис. 34.1, а.

34.2.2. Рассеяние Рэлея–Ганса–Дебая

Частицы, размер которых соизмерим с длиной волны падающего света, а показатель преломления почти такой же, как у окружающей среды ($\Delta n \leq 0,05$), слабо рассеивают свет. В этом случае полярная диаграмма показывает, что в направлении, обратном направлению исходного лазерного пучка, свет рассеивается меньше. Таким образом,

$$I \propto \frac{V^2}{\lambda^4} P(K).$$

Здесь $P(K)$ характеризует помехи, связанные с тем, что размер частиц приближается к длине волны падающего света, а угловая зависимость рассеяния выражается через модуль вектора рассеяния:

$$|K| = \frac{4\pi n_1}{\lambda} \sin \frac{\theta}{2},$$

где n_1 – показатель преломления окружающей частицу среды; λ – длина волны падающего света и θ – угол между направлением пучка и направлением, по которому он измеряется. При определенных значениях θ свет не рассеивается вообще. Таким образом, получается характерная картина рассеяния в виде двух окружающих частицу лепестков. Рассеяние по механизму РГД характерно для многих биологических макромолекул и микроорганизмов и происходит в основном в направлении распространения пучка [62].

34.2.3. Рассеяние Ми

При размере частиц, большем или равном длине волны света, и произвольном показателе преломления необходимо использовать теорию рассеяния, развитую Ми. Здесь также преобладает рассеяние в прямом направлении (рис. 34.1, в), однако на полярной диаграмме появляется еще несколько лепестков. Число минимумов на полярной диаграмме больше, но они менее выражены, чем в случае РГД-рассеяния, вследствие фазового распределения световой энергии вокруг поверхности частицы.

Формула Ми для интенсивности рассеяния включает ряды суммирования сложных функций и, таким образом, предполагает довольно большой объем вычислительной работы. Существуют, однако, два простых аналитических приближения, которые часто применимы. В приближении Фраунгофера [97] предполагается, что частицы непрозрачны и размер их больше длины волны света; оно достаточно хорошо описывается известным графиком Эйри. В приближении аномальной дифракции [101] принимается, что размер частиц тот же, но их показатель преломления близок к показателю преломления среды.

34.3. Методы, основанные на рассеянии света

Существует большое число методов, в которых рассеяние света используется в аналитических целях. Такие методы удобно разделить на две группы: 1) статические методы, в которых непосредственно измеряют интенсивность рассеянного света, и 2) динамические методы, в которых измеряют флуктуации интенсивности рассеянного света, в принципе не зависящие от абсолютной или относительной интенсивности рассеяния.

34.3.1. Статические методы светорассеяния

Статические методы светорассеяния давно известны в биохимии, микробиологии и других биологических дисциплинах. Такие методы, как турбидиметрия, нефелометрия, угловое или дифференциальное рассеяние света и т. д., достаточно хорошо описаны в литературе и являются обычными методами рутинного анализа биологических объектов. Поэтому нет необходимости детально рассматривать их здесь. Несмотря на то что многие аспекты рассеяния света до сих пор изучены плохо (например проблема произвольной формы [39, 107, 11]), рассеяние света является важным средством определения размеров частиц [4, 5] и изучения их свойств.

Теоретические и практические аспекты рассеяния света клетками и субклеточными частицами довольно полно рассмотрены в [66], а в работах [62, 63] дан обширный обзор рассеяния света бактериями и подобными им частицами. Принципы светорассеяния широко используют, например, при изучении морфологии ядер и клеток методом проточной цитометрии (измеряют рассеяние света вдоль и перпендикулярно потоку [91]), для обследования эпидермальных клеток гониометрическими методами [16], лазерного контроля деформации эритроцитов [78]. Лазеры широко используют также для быстрого скрининга мочи на наличие в ней бактерий (бактериурия) нефелометрическим методом [6].

Методы рассеяния лазерного излучения под большими и малыми углами можно использовать при исследовании таких малых частиц, как лизосомы [59], или для разработки новых методов изучения микробных популяций, например метода углового или дифференциального светорассеяния [113, 114]. Более современные методы, как, например, метод круговой интенсивности дифференциального рассеяния света [85], развиваются из хорошо известных методов светорассеяния, в данном случае метода кругового дихроизма (см., например, [65]), и уже воплощены в серийно выпускаемых приборах (фирмой Mesa Diagnostics Inc., Сан-Диего) для клинических микробиологических исследований. Здесь следует упомянуть также методы электрического дихроизма и двойного лучепреломления [74], используемые для изучения ориентированных в электрическом поле частиц. Такие методы широко использовали для изучения ДНК, например в работах [23, 115–117].

Лазеры применяют также при изучении комбинационного рассеяния и рассеяния Мандельштама – Бриллюэна [118]. Последнее возникает в результате взаимодействия монохроматического (лазерного) излучения с термоакустическими флуктуациями в исследуемом веществе. Рассеяние Мандельштама – Бриллюэна и его использование для анализа биологических систем обсуждается в работе [84]. Комбинационное рассеяние наблюдается при взаимодействии когерентного лазерного света с веществом, что приводит к сдвигу частоты рассеянного света, содержащему информацию о молекулярных колебаниях в исследуемом образце. Спектроскопию комбинационного рассеяния используют для изучения многих биомолекул *in vitro* [79, 100], а с недавнего времени – и интактных клеток [57].

Еще один метод используется прежде всего для дисперсионного анализа минерального вещества (например, продуктов сгорания топлива, выхлопных газов) с размером частиц больше 1 мкм – это дифракционное рассеяние света, обычно рассматриваемое в рамках приближения Фраунгофера. Этот метод как потенциально полезный для биотехнологии заслуживает более детального обсуждения. При дифракционном рассеянии света расширенный параллельный пучок лазерного излучения проходит через ансамбль неподвижных или движущихся макромолекул или частиц. Пространственное распределение энергии дифрагированного света анализируют с помощью дифрактограммы Эйри, представляющей собой распределение интенсивности рассеянного света, которое регистрируют на обратной фокальной плоскости линзы, расположенной симметрично на оси пучка и сфокусированной на бесконечность (рис. 34.2). Для монодисперсного образца с радиусом частиц a имеем

$$a = \frac{0,61\lambda f}{r},$$

где λ – длина волны падающего пучка; f – фокусное расстояние линзы (Фурье) и r – радиус первого кольца нулевой интенсивности дифрагированного света. Для полидисперсных образцов распределение размеров рассчитывают через преобразование бесселевой функции. Этим методом можно определять размеры частиц от ~ 1 мкм до 1 мм, особенно при высокой концентрации [7, 8, 10, 71, 97].

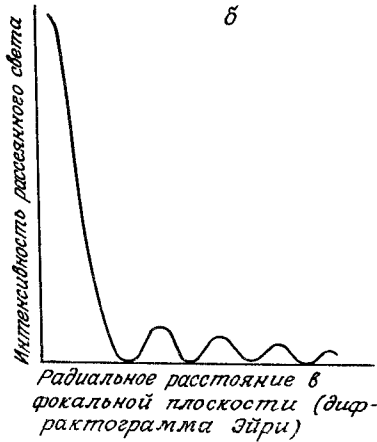
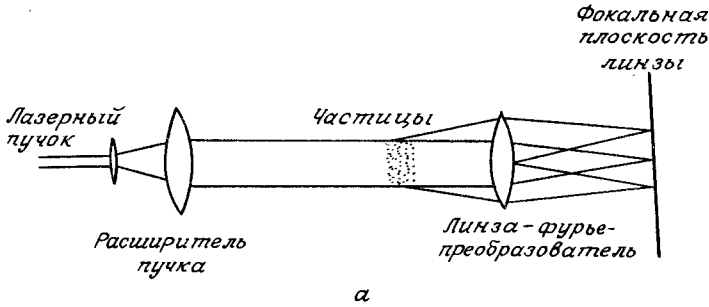


Рис. 34.2. Френгоферовская дифракция. а: схема оптической установки для измерения френгоферовской дифракции; б: распределение интенсивности рассеянного света (дифрактограмма Эйри). Диаметр дифракционных колец обратно пропорционален диаметру частиц. Сама дифрактограмма не зависит от положения частицы, и, следовательно, измерения можно проводить с частицами, движущимися с любой скоростью.

34.3.2. Динамические методы светорассеяния

Выше были кратко описаны различные аналитические методы, в основе которых лежит статическое рассеяние света на макромолекулах и частицах. Если, однако, исследуемый ансамбль частиц представляет собой суспензию, то частицы совершают броуновское движение и элементарные акты рассеяния на каждой частице вносят свой вклад (на некотором расстоянии от самой частицы) в результирующую интенсивность и фазу рассеянного света. Поскольку броуновское движение частиц неупорядочено, наблюдаемая на расстоянии интенсивность рассеянного света флуктуирует во времени; характерные времена флуктуаций интенсивности несут информацию о размерах частиц и распределении их размеров. Это является основой динамического метода светорассеяния, или спектроскопии интенсивности флуктуаций (известного также как спектроскопия квазиупругого рассеяния света, СКУРС). Анализ характерных времен флуктуаций интенсивности проводят с помощью электронных процессоров для обработки сигналов, получая в результате распределение размеров частиц и т. д. Если в качестве процессора используют коррелятор фотонов, как сейчас обычно и делают, то метод называется фотонно-корреляционной спектроскопией (ФКС).

Существует также другая разновидность динамического метода светорассеяния, которая может быть пригодна для сенсоров, например для измерения скоростей потоков жидкостей. В этом варианте, известном как лазерная доплеровская скоростиметрия (ЛДСМ), жидкость, содержащую макромолекулы или суспендированные частицы, зондируют одним или несколькими лазерными пучками. Геометрия лазерных пучков и систем детектирования света зависит от природы исследуемого образца. Этот вопрос будет обсуждаться ниже. Скорость движущихся частиц определяют по характерным временам флуктуаций интенсивности.

Упомянутые здесь новые мощные методы потенциально являются весьма ценными для изучения биологических макромолекул и частиц. И хотя они разработаны сравнительно недавно и неизвестны большинству биотехнологов, уже имеется несколько серийно выпускаемых приборов, которые начинают применяться в биологических исследованиях.

34.3.2.1. Фотонно-корреляционная спектроскопия. Этот метод в настоящее время хорошо разработан и широко используется. Он основан на том (рис. 34.3), что непрерывный лазерный луч видимого света пропускают через суспензию макромолекул или частиц, находящихся в броуновском движении. Часть излучения лазера рассеивается частицами, рассеянный свет собирают линзой и регистрируют фотодетектором, который генерирует электрический сигнал, пропорциональный интенсивности детектируемого света. Интенсивность рассеянного света флуктуирует с характерным временем, которое определяется временем ее диффузии на расстояние, равное длине волны света, зависящим в свою очередь от гидродинамического радиуса частицы.

Электрический сигнал фотодетектора анализируют с помощью цифрового процессора сигналов, называемого фотонным коррелятором. Коррелятор рассчитывает средние значения сигнала, умноженного на самого себя при различных временах запаздывания, и таким образом строится автокорреляционная функция сигнала. Полученная автокорреляционная функция обычно экспоненциально убывает с увеличением времени запаздывания. Время запаздывания связано с размером рассеивающих свет макромолекул или частиц. Детально анализируя экспоненциальные автокорреляционные функции, можно построить функцию распределения частиц по размерам.

Математическое описание рассмотренного выше процесса обработки данных можно вкратце представить следующим образом. Для сферических макромолекул одного и того же размера, диффундирующих в результате броуновского движения, корреляционная функция электрической составляющей рассеянного света имеет вид

$$g^{(1)}(\tau) = e^{(-D_1 K^2 \tau)} e^{i\omega_0 \tau},$$

где D_1 – коэффициент диффузии макромолекул; τ – время запаздывания; K – модуль вектора рассеяния, зависящий от угла наблюдения; ω_0 – угловая частота падающего света. Можно показать, что при наличии большого числа рассеивающих частиц измеряемая автокорреляционная функция описывается выражением

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + B |g^{(1)}(\tau)|^2 = 1 + B e^{(-2D_1 K^2 \tau)}$$

и представляет собой экспоненциально затухающую зависимость. Величина D_1 связана с размером частиц уравнением Стокса – Эйнштейна:

$$D_1 = \frac{kT}{6\pi\eta R_h},$$

где k – константа Больцмана; T – температура; η – вязкость и R_h – гидродинамический радиус макромолекулы. Таким образом, R_h можно непосредственно оценить из значений автокорреляционной функции.

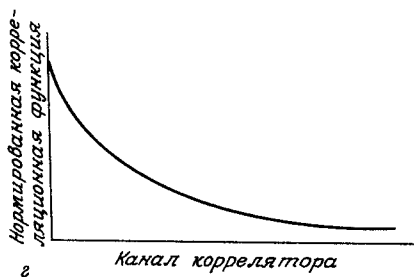
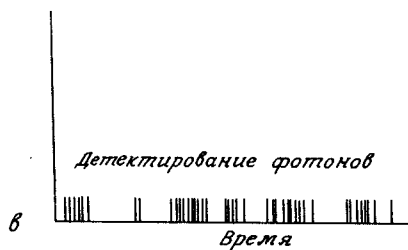
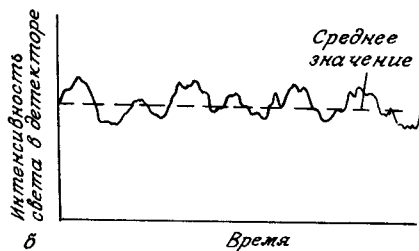
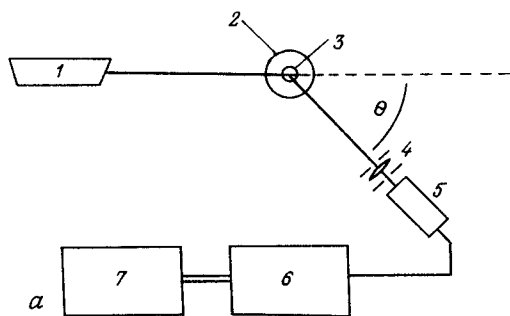


Рис. 34.3. Фотонно-корреляционная спектроскопия. а: схема расположения компонентов ФКС-спектрометра; 1—лазер; 2—термостат; 3—ячейка с образцом; 4—светособирающая оптика; 5—детектор; 6—коррелятор; 7—компьютер; б: зарегистрированные детектором флуктуации интенсивности света (график содержит информацию о скоростях диффузии рассеивающих частиц); в: флуктуации интенсивности, превращенные в счетчике фотонов в последовательность стандартных фотозлектронных импульсов. Таким образом, пики интенсивности превращаются в «пачки» импульсов; г: сигнал в виде приведенных выше стандартных импульсов подается в цифровой коррелятор, где генерируется корреляционная функция. На графике показана нормированная с учетом фона корреляционная функция. Пояснения см. в тексте.

Конечно, большинство реальных систем являются полидисперсными, и тогда $|g^{(1)}(\tau)|$ представляет собой сумму различных экспоненциально убывающих функций. Формально $|g^{(1)}(\tau)|$ можно представить как

$$|g^{(1)}(\tau)| = \int_0^{\infty} G(\Gamma)e^{-\Gamma\tau}d\Gamma,$$

где ширина линии $\Gamma = D_r K^2$, а $G(\Gamma)$ —нормированная по интенсивности функция распределения ширины линии рассеянного света. Чтобы оценить $G(\Gamma)$ и отсюда найти распределение частиц по радиусам, пользуются обратным преобразованием Лапласа. Более подробное и строгое рассмотрение данного вопроса можно найти в работах [24, 33–35, 41, 77, 86, 102].

Обычно ФКС успешно применяют при содержании частиц $10^4 - 10^{10}$ в 1 мл и их размерах в диапазоне от нескольких нанометров до нескольких микрон.

34.3.2.2. Лазерная доплеровская скоростиметрия. Лазерная скоростиметрия является неразрушающим методом получения информации о скорости макромолекул или частиц путем анализа флуктуаций интенсивности света, обуславливаемых движением макромолекул или частиц через один или несколько лазерных пучков. С помощью одной и той же аппаратуры можно измерять скорость в диапазоне от мкм/мин до км/с. Схема типичной экспериментальной системы ЛДСМ приведена на рис. 34.4. Непрерывный плоскополяризованный монохроматический лазерный пучок (обычно мощностью несколько мегаватт) делят на два пучка равной интенсивности, которые затем фокусируют, так чтобы они пересекались в потоке жидкости в точке, в которой скорость варьирует. Находящиеся в потоке небольшие частицы, проходя через область пересечения пучков (или измерительную ячейку), рассеивают свет обоих пучков с несколько различным доплеровским смещением частоты, поскольку по отношению к лазерным пучкам они движутся в разных направлениях. Часть рассеянного лазерного света собирают помещенной в удобном месте линзой и направляют в фотодетектор. Электрический сигнал фотодетектора содержит данные о частотах, линейно связанных с разностью доплеровских частот рассеянных лазерных пучков и, таким образом, со скоростями частиц. В случае сильных световых сигналов для оценки скоростей частиц можно использовать аппаратуру для обработки аналоговых сигналов, например анализатор частоты; более слабые оптические сигналы обрабатывают, как и в ФКС, с помощью фотонного коррелятора, получая при этом статистическое распределение скоростей. При описанной геометрии оптики системы измеряют компоненту скорости, перпендикулярную биссектрисе угла между лазерными пучками и лежащую в плоскости этих пучков. Можно показать, что для статистически независимых ортогональных флуктуаций скоростей автокорреляционная функция интенсивности описывается выражением

$$g^{(2)}(\tau) = \int_0^{\infty} P(u) \exp\left(\frac{-u^2\tau^2}{r^2}\right) \left[1 + \frac{m^2}{2} \cos\left(\frac{2\pi u\tau}{s}\right)\right] du,$$

где r – радиус лазерного пучка; m – мера контрастности сигналов; u – измеряемая компонента скорости; $P(u)$ – распределение вероятностей; $s = \lambda/2 \sin(\theta/2)$ – ширина интерференционной полосы. В данном случае функция имеет вид экспоненциально затухающих синусоидальных колебаний, и если $u^2\tau^2 \ll r^2$, то

$$g^{(2)}(\tau) = 1 + \frac{m^2}{2} \int_0^{\infty} P(u) \cos\left(\frac{2\pi u\tau}{s}\right) du.$$

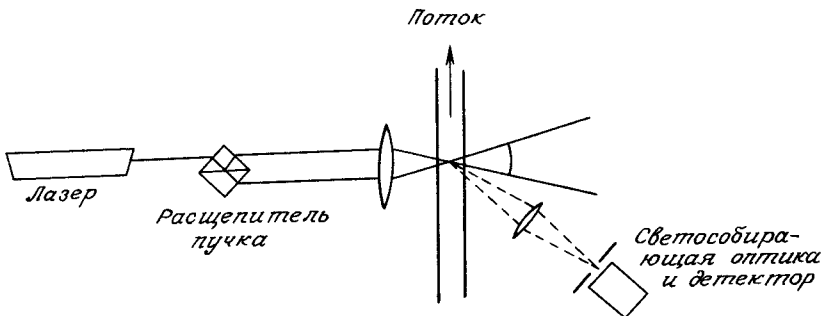


Рис. 34.4. Схема установки для ЛДСМ с некогерентной детектирующей системой (пояснения см. в тексте).

Отсюда с помощью преобразования Фурье можно найти $P(u)$ и статистическое распределение скоростей [34, 86].

34.4. Применение динамических методов светорассеяния в биологии

Хотя динамические методы светорассеяния еще не нашли широкого применения в исследованиях структуры и свойств в биологических систем, потенциальная полезность этих методов для решения широкого круга вопросов продемонстрирована в большом числе работ. Использованию статистических и динамических методов светорассеяния в биологии посвящен ряд обзоров [17, 31, 32]. Последние достижения в этой области обсуждаются в работе [12]. В работе [94] отмечены особенности биологических образцов, которые следует учитывать при изучении их методами рассеяния света. В частности, рассеяние света биологическими макромолекулами-полиэлектролитами [43, 70] и изучение их методом СКУРС [50] существенно зависят от таких факторов, как пробоподготовка [98], выбор растворителя, температура и давление [55].

Рассеяние света полимерами является предметом обширной монографии [55], в которой рассматривается множество вопросов, имеющих непосредственное отношение к биологическим объектам. В работах [56, 102] обсуждается применение комбинационного рассеяния и рассеяния Мандельштама-Бриллюэна при исследовании полимеров блочной полимеризации, растворов полимеров, а также аморфных полимеров и полимерных гелей.

В обзоре [44] в сжатой форме обобщены результаты исследования полимеризации, ассоциации и агрегации молекул и макромолекул методами светорассеяния. В работах [67, 73] на примерах мицелл и заряженных белков обсуждаются взаимодействия между частицами и их влияние на результаты определения размеров частиц методом СКУРС. Интересно, что при исследовании иммуноаналитической реакции динамические методы светорассеяния, в частности ФКС, дают 100-кратное (а в режиме ингибирования даже 1000-кратное) увеличение чувствительности по сравнению с обычными методами иммуноанализа. По чувствительности рассматриваемые оптические методы сравнимы с радиоиммуноанализом, но в них не используются радиоактивные реагенты, не требуется предварительного разделения связанного и несвязанного антигена и можно анализировать образцы объемом до 1 мкл [26, 104, 105]. В работе [90] с помощью скоростной лазерной нефелометрии контролировали реакцию иммуноосаждения. Применению методов светорассеяния для определения специфических белков посвящен обзор [80]. Разработан также другой оптический метод иммуноанализа, в котором измеряют свет, отраженный от покрытой антителами силиконовой поверхности под углом, близким к псевдобрюстеровскому [2].

С помощью динамических методов светорассеяния проводят также изучение структуры гелей и механизмов их образования [88, 99]. В работе [102] исследовали диффузию макромолекул в гелях, в частности движение фракций декстрана в гелях альгината кальция и агарозы. Динамические методы светорассеяния неоднократно использовали для исследования структуры и поведения ДНК в растворах [33, 35, 41]. В работе [72] изучены изменения конформации спирали ДНК при связывании различных агентов. Обнаруженное с помощью СКУРС «расщепление» коэффициента диффузии ДНК динуклеосомального размера (в среднем 375 пар оснований) после понижения ионной силы свидетельствует о том, что предположение о простой связи гидродинамического радиуса с размером частицы может приводить к ошибочным заключениям относительно конформации молекулы [87]. Изучение с помощью динамического рассеяния света переходов типа скручивание – раскручивание у рибонуклеазы А в широком диапазоне температур показало ценность этого метода для исследования

денатурации белков и плавления ДНК. Возможность с помощью ФКС и других методов светорассеяния получать данные о размерах и форме частиц имеет большое значение при определении третичной структуры и свойств биологически важных макромолекул, например грамицидина [38] и бычьего фактора VIII [48].

В работе [56] методом ФКС исследовали животный белок коллаген, используя новый подход, позволяющий одновременно определять длину молекулы и вязкость раствора. Полученные с помощью как статического, так и динамического метода светорассеяния данные о размерах протеогликановых агрегатов хорошо согласуются с результатами электронной микроскопии; это указывает на то, что агрегаты, наблюдавшиеся под электронным микроскопом, присутствовали также и в растворе.

Динамические методы светорассеяния хорошо зарекомендовали себя при изучении структуры мицелл и их взаимодействия между собой [27, 52, 67], в частности казеиновых мицелл [51, 54]. Аналогичными методами изучают также везикулы [93, 119].

Легкость получения монодисперсных образцов вируса табачной мозаики (ВТМ) регулярного строения привела к тому, что наряду со сферическими частицами полистирола, он стал модельным объектом в исследованиях с применением динамического рассеяния света. Реально изучение полидисперсных растворов ВТМ методом ФКС [112] продемонстрировало способность этого метода различать одновременно несколько видов частиц разных размеров. В работах [19, 83] охарактеризованы суспензии ряда других вирусов.

Попытка применения оптической техники для определения группы крови [1] с использованием метода иммуноосаждения показала эффективность такого подхода по сравнению с обычным методом, используемым в судебной медицине. С помощью ФКС и других методов светорассеяния был изучен хемотаксический отклик *Escherichia coli* [109]. ФКС применяли и для анализа фототаксиса подвижной одноклеточной водоросли [3]. Значительный интерес вызывает подвижность еще одного типа клеток, а именно сперматозоидов. Краткие обзоры по данному вопросу можно найти в работах [40, 103].

Более детально подвижность клеток и микроорганизмов и ее изучение динамическими методами светорассеяния рассмотрены в работе [13]. Биохимическое значение таких исследований обсуждается автором [61]. ФКС также является ценным методом изучения такого специфического вида движения клеток, как мышечное сокращение [20, 21].

Исследование переходного процесса двойного лучепреломления при повороте цилиндрических молекул в электрическом поле в комбинации с методом СКУРС позволяет определять как длину, так и диаметр таких частиц. Гибкие молекулы можно характеризовать тем, насколько их длина в растворе отличается от предсказываемой для цилиндрических частиц [42, 45].

Рассматриваемыми методами исследовали также электрическую поляризуемость и поведение фрагментов ДНК и нитевидного вируса Рf3. В обзоре [58] обсуждается влияние электрического поля на рассеяние света. В сравнительно недавней работе [110] детально рассмотрена комбинация ЛДСМ с электрофорезом, в том числе применительно к живым клеткам, везикулам и ДНК с конденсирующимися противоионами. В настоящее время выпускаются автоматические приборы, объединяющие ЛДСМ с электрофоретическими системами, которые позволяют изучать с высокой точностью и экспрессностью (за 1–3 мин) электрофоретическую подвижность лейкоцитов и лимфоцитов при разных типах лейкемии [96], а также электрофоретическую подвижность эритроцитов [22].

34.5. Перспективы методов светорассеяния

Разработка все более тонкой и чувствительной аппаратуры и прогресс в понимании теоретических основ методов светорассеяния привели к появлению большого числа разнообразных приборов, теперь уже вполне доступных исследователям, работающих в различных областях биологии. Хотя от улучшения конструкций приборов и их характеристик в целом рутинный анализ и исследования более сложных биологических факторов только выигрывают, все же причиной плохой воспроизводимости и неоднозначности данных является обычно именно чрезвычайная сложность и изменчивость биологических систем. Вообще эти проблемы возникают при применении в биологических исследованиях любых методов, связанных с рассеянием и другими взаимодействиями вещества со светом. Таким образом, на первый план выдвигается проблема обеспечения селективности оптических методов при изучении тех или иных биологических процессов.

Для достижения селективности используют метки – химические (например, флуоресцентные) либо биохимические (например, полистирольные шарики, покрытые моноклональными антителами), – а также комбинации различных методов детектирования. К последним можно отнести и разрабатываемый в настоящее время многопараметровый метод светорассеяния [85], который может стать одним из наиболее перспективных способов дифференциации различных частиц и микробных клеток. Следует, однако, иметь в виду, что получение этим методом гарантированно воспроизводимых результатов может быть проблематичным из-за значительного влияния колебаний состава среды для роста, условий и времени отбора проб на конформацию и состав ядерного материала и, следовательно, на форму клеток.

В тех случаях, когда по изменению рассеяния света контролируют образование агрегатов, как, например, при контроле реакции иммуноосаждения с помощью нефелометрии или ФКС, чувствительность метода может серьезно понижаться в присутствии значительных количеств рассеивающего материала основы, как, например, в сывороточных препаратах. Чувствительность можно повысить, снабжая реагирующие вещества оптическими маркерами, например относительно крупными шариками из полистирола (размером 100 нм), которые рассеивают свет больше, чем представляющие интерес или создающие фон макромолекулы [80]. Однако в моноэпитопических реакциях антитело – антиген, где образуются только агрегаты низкого порядка и, таким образом, уровень фона довольно высок, требуются более специфичные метки (например, флуоресцентные).

В будущем методы светорассеяния могут найти новые области применения в промышленности, например для непрерывного мониторинга процессов ферментации, в иммуноанализе (как уже обсуждалось выше), обработке сточных вод и других областях, где требуется мониторинг небольших частиц.

Рассмотренные выше методы эволюционировали большей частью из ранних несовершенных оптических инструментов и теорий в те мощные аналитические инструменты, которые сегодня существуют в исследовательских лабораториях. Однако в определенных ситуациях применение даже этих современных систем ограничено из-за громоздкости и негибкости их компонентов (линз, зеркал, апертур и т. д.). Из ряда недостатков, присущих большинству из этих методов, наиболее очевидными являются высокая стоимость, большие габариты, необходимость частой и тщательной градуировки (за исключением ФКС) и высокой квалификации оператора, а нередко и большое число манипуляций и трудоемкость подготовки образцов. Обычно анализы проводят с разной быстротой, по одному и часто после предварительного выделения или разделения. Кроме того, обычно исследуемый образец должен быть отобран из представляющего интерес места и затем помещен в измерительную систему.

Оптические волокна предлагают революционизирующую альтернативу существующим оптическим приборам. С помощью оптических волокон многие из описанных выше методов могут быть реализованы в конфигурации, имеющей ряд дополнительных преимуществ. Современная волоконная оптика способна поддерживать определенную поляризацию и фазу света (что является предпосылкой многих оптических аналитических методов), позволяет проводить дистанционный анализ (на расстоянии многих километров) и становится все дешевле. Малый диаметр оптических волокон позволяет использовать для анализа пробы очень малых объемов (до 1 мкл) и тем самым свести к минимуму расход, возможно, дорогих реагентов. С волокнами малых размеров измерения можно проводить *in situ* или *in vivo*, что ранее считалось невозможным, а свойства волокон инертность и прочность допускают их применение в агрессивных средах.

Возможность очень быстрой адресации единственного источника и детектора к большому числу оптических волокон с помощью мультиплексоров должна существенно снизить стоимость мультианализаторов в расчете на «один канал». Одновременная революция в микроэлектронике и создание все меньших, более быстродействующих и мощных электронных микросхем ускорит развитие истинно биосенсорных приборов, сочетающихся с наиболее тонкими из существующих оптических методов.

Аналитические приборы, можно думать, займут центральное место в лабораториях и, что еще важнее, в промышленности. Они будут связаны, возможно, с сотнями расположенных на больших расстояниях сенсоров, работающих по принципу рассеяния света. Примеры таких нетрудоемких методов анализа уже начинают появляться, например лазерная установка комбинационного рассеяния, соединенная с удаленной на расстояние 1 км точкой измерения мультимодовыми волокнами, включенными в плавное пористое стекло [53].

Методы ФКС и ЛДСМ уже успешно испытаны в виде волоконно-оптических приборов миллиметровых габаритов. Авторы уверены, что и другие методы светорассеяния будут применяться в сочетании с волоконной оптикой.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арефьев И. М., Барсегьянц Л. О., Эсков А. П., Алексеева В. И.* Судебно-медицинская экспертиза. 1978. Т. 21. № 1. С. 26–7.
2. *Arwin H., Lundstrom I.* A reflectance method for quantification of immunological reactions on surfaces. *Anal. Biochem.*, **145**, 106–12 (1985).
3. *Ascoli C., Frediani C.* The application of laser light scattering to the study of photo-responses of unicellular motile algae. In *The application of laser light scattering to the study of biological motion* (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advances Science Institute Series, Vol. 59, pp. 669–679. Plenum Press, New York, 1983.
4. *Barth H. G.*, Modern methods of particle size analysis. Wiley, New York, 1984.
5. *Barth H. G., Sun S.-T.* Particle size analysis. *Anal. Chem.*, **57**, 151R–75R (1985).
6. *Bayardelle P., Richet H.* Rapid screening for bacteriuria with a laser nephelometer. *Can. J. Microbiol.*, **30**, 927–9 (1984).
7. *Bayvel L. P., Jones A. R.* Electromagnetic Scattering and its Application. Applied Science Publishers, Englewood, N. J., 1981.
8. *Bayvel L. P., Eisenklam P., Jones A. R.* A light scattering instrument for measuring drop sizes in the range of 0.1 to 1000 μm . *Proc. 2nd Int. Conf. on Liquid Atomization and Spray Systems (ICLASS)*, June 1982, Wisconsin, pp. 329–34.
9. *Benson M. C., McDougal D. C., Coffey D. S.* The application of perpendicular and forward light scattering to assess nuclear and cellular morphology. *Cytometry*, **5**, 515–22 (1984).
10. *Bertero M., Pike E. R.* Particle size distributions from Fraunhofer diffraction. I. An analytical eigenfunction approach. *Optica Acta*, **30**(8), 1043–9 (1983).
11. *Bertero M., Brianzi P., Pike E. R., DeVilliers G., Lan K. H., Ostrowsky N.* Light scattering polydispersity analysis of molecular diffusion by Laplace transform inversion of weighted spaces. *J. Chem. Phys.*, **15**, 1551–6 (1985).

12. *Bloomfield V. A.* Biological applications. In *Dynamic light scattering* (ed. R. Percora), pp. 363–416. Plenum Press, New York, 1985.
13. *Boon J. P.* Motility of living cells and micro-organisms. In *The application of laser light scattering to the Study of Biological Motion* (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institute Series, Vol. 59, pp. 561–606. Plenum Press, New York, 1983.
14. *Brenci M., Falciai R., Scheggi A. M.* Multimode optical fibre sensors. *Alta Frequenza*, **52**(3), 206–8 (1983).
15. *Brown D. C.* Solid state lasers. In *Applied optics and optical engineering*. Vol. VI, Chapter 1. Academic Press, New York, 1980.
16. *Bruls W. A. G., van der Luen J. C.* Forward scatter properties of human epidermal layers. *Photochem. and Photobiol.*, **40**(2), 231–42 (1984).
17. *Burchard W., Cowie J. M. G.* Selected topics in biopolymeric systems. In *Light scattering from polymer solutions* (ed. M. B. Huglin), pp. 725–787. Academic Press, New York, 1972.
18. *Butler J. F.* Semiconductor diode lasers. In *Applied optics and optical engineering*, Vol. VI, chapter 3, pp. 53–88. Academic Press, New York, 1980.
19. *Camerini-Otero R. D., Pusey P. N., Koppel D. E., Schaefer D. W., Franklin R. M.* Intensity fluctuation spectroscopy of laser light scattered by solutions of spherical viruses: R17, Q, BSV, PM2, and T7. I. Diffusion coefficients, molecular weights, solvation and particle dimensions. *Biochemistry*, **13**(5), 960–72 (1974).
20. *Carlson F. D.* The application of quasi-electric light scattering to the study of muscular contraction. In *The application of laser light scattering to the study of biological motion* (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer) NATO Advanced Science Institute Series, Vol. 59, pp. 405–58. Plenum Press, New York, 1983.
21. *Carlson F. D., Fraser A.* Intensity fluctuation autocorrelation studies of the dynamics of muscle contraction. In *Photon correlation and light beating spectroscopy* (eds. H. Z. Cummins, E. R. Pike). NATO Advanced Study Institute Series B: Physics, vol. 3, pp. 519–38. Plenum Press, New York, 1973.
22. *Carter T., Dahne C., Place J. F.* Method for the determination of species in solution with an optical waveguide. *Eur. Pat. Appl. No. 0-075-353*, 1982.
23. *Charney E., Yamaoka K.* Electric dichroism of deoxyribonucleic acid in aqueous solution: electric field dependence. *Biochemistry*, **21**, 834–42 (1982).
24. Scattering techniques applied to supramolecular and non-equilibrium systems. *Chen S.-H., Chu B., Nossal R.* (eds.). Plenum Press, New York, 1981.
25. *Cherin A. H.* An introduction to optical fibres. McGraw-Hill, New York, 1983.
26. *Cohen R. J., Benedek G. B.* Immunoassay by light scattering spectroscopy. *Immunochemistry* **12**, 349–51 (1975).
27. *Corti M., Minero C., Degiorgio V.* Light scattering from micellar solution—proposal for a light scattering standard. In *The application of laser light scattering to the study of biological motion* (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer) NATO Advanced Science Institute Series, Vol. 59, pp. 333–46. Plenum Press, New York, 1983.
28. *Cramp J. H. W., Ried R. F.* Sensitive optical fibre. *Eur. Pat. Appl. No. 0-062-443*, 1982.
29. *Cramp J. H. W.* Optical Fibre Sensor, *Eur. Pat. Appl. No. 0-061-884*, 1982.
30. *Culshaw B.* Optical systems and sensors for measurement and control. *J. Phys. E: Sci. Instrum.*, **16**, 978–86 (1983).
31. *Cummins H. Z.* Application of light beating spectroscopy to biology. In *Photon correlation and light beating spectroscopy* (eds. H. Z. Cummins, E. R. Pike), NATO Advanced Study Institute Series B: Physics, vol. 3, pp. 285–330. Plenum Press, New York, 1973.
32. *Cummins H. Z.* Analysis of diffusion of biological molecules by quasi-elastic light scattering. In *The application of laser light scattering to the study of biological motion* (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institute Series, Vol. 59, pp. 171–208. Plenum Press, New York, 1983.
33. *Photon correlation and light beating spectroscopy.* Cummins H. Z., Pike E. R. (eds.). NATO Advanced Study Institute Series B: Physics, vol. 3, Plenum Press, New York, 1974.
34. *Photon correlation spectroscopy and velocimetry.* Cummins H. Z. (ed.). Plenum Press, New York, 1977.
35. *Dahneke B. E.* Measurement of suspended particles by quasi-elastic light scattering. John Wiley, New York, 1983.
36. *Dakin J. P.* Optical fibre sensors—principles and applications. *Fibre Optic '83*, SPIE 374, 172–82 (1983).
37. *Degiorgio V.* Physical principles of light scattering. In *The application of laser light scattering to the study of biological motion* (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institutes Series, vol. 59, Plenum Press, New York, 1983.
38. *De La Torre G., Martinez M. C. L., Tirado M. M.* Dimensions of short, rodlike macromolecules from

- translational and rotational diffusion coefficients. Study of the gramicidin dimer. *Biopolymers*, **23**, 611–15 (1984).
39. *Drain L. E., Smith N., Dalzell W.* Aspects of light scattering by spherical particles. Proc. Max. Born Conf., SPIE 369, 610–15 (1982).
 40. *Earnshaw J. C.* Laser doppler velocimetry in a biological context. In *The application of laser light scattering to the study of biological motion* (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institute Series, vol. 59, pp. 123–142. Plenum Press, New York, 1983.
 41. The application of laser light scattering to the study of biological motion. *Earnshaw J. C., Steer M. W.* (eds.). NATO Advanced Science Institutes Series, Series A, Life Sciences, Vol. 59. Plenum Press, New York, 1983.
 42. *Eden D., Elias J. G.* Transient electrical birefringence of DNA restriction fragments and the filamentous virus P13. In *Measurement of suspended particles by quasi-elastic light scattering* (ed. B. E. Dahneke), pp. 401–38. John–Wiley, New York, 1983.
 43. *Eisenberg H.* Light scattering intensity studies in multicomponent solutions in biological macromolecules. In *Photon correlation and light beating spectroscopy* (eds. H. Z. Cummins, E. R. Pike). NATO Advanced Study Institute Series B: Physics, vol. 3, pp. 151–68. Plenum Press, New York, 1973.
 44. *Elias H.-G.* The study of association and aggregation via light scattering. In *Light scattering from polymeric solutions* (ed. M. B. Huglin), pp. 397–457. Academic Press, New York, 1972.
 45. *Elias H.-G., Eden D.* Transient electric birefringence study of the persistence length and electric polarizability of restriction fragments of DNA. *Macromolecules*, **14**, 410–19 (1981).
 46. *Ford N. C.* Light scattering apparatus. In *Dynamic light scattering* (ed. R. Pecora), pp. 7–57. Plenum Press, New York, 1985.
 47. *Forsyth J. M., Wilson J.* Gas lasers. Applied optics and optical engineering, Vol, VI, Chapter 2, pp. 29–52. Academic Press, New York, 1980.
 48. *Gabriel D. G., Kirkland J. A., Cooper H. A., Wagner R. H.* A light scattering study of bovine factor VIII. *Arch. Biochem. Biophys.*, **231**(1), 189–92 (1984).
 49. *Giallorenzi T. G., Bucaro J. A., Dandridge A., Sigel G. H., Cole J. H., Rashleigh S. C., Priest R. G.* Optical fibre sensor technology. *IEEE J. of Quantum Elect.*, **QE18**(4), 626–65 (1985).
 50. *Giordano R., Micali N.* Correlation spectroscopy and structural properties of macromolecular solutions. In *The application of laser light scattering to the study of biological motion* (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institute Series, vol. 59, pp. 221–6. Plenum Press, New York, 1983.
 51. *Griffin M. C. A., Anderson M.* Laser light scattering study of the fractionation of casein micelles in skim milk by controlled pore glass chromatography. In *The application of laser light scattering to the study of biological motion* (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institute Series, vol. 59, pp. 347–52. Plenum Press, New York, 1983.
 52. *Hirsch E., Candau S., Zana R.* Micellar structure and inter-micellar interactions in solutions in tetradecyltrimethylammonium bromide in the presence of 1-pentanol: light scattering and viscosity study. *J. Coll. Interface Sci.*, **97**(2), 318–26 (1984).
 53. *Hirschfield T.* Remote analysis by fibre optics. Proc. ICO '84, Sapporo, Japan, 1984.
 54. *Holt C.* Structural studies on bovine casein micelles by laser light scattering. In *The application of laser light scattering to the study of biological motion* (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institute Series, vol. 59, pp. 353–8. Plenum Press, New York, 1983.
 55. Light scattering from polymer solutions. Huglin M. D. (ed.). Academic Press, New York, 1972.
 56. *Hwang J. S., Cummins H. Z.* Dynamic light scattering studies of collagen. *J. Chem. Phys.*, **77**(2), 616–21 (1982).
 57. *Jeannesson P., Manfait M., Jardillier J.* A technique for laser Raman spectroscopy studies of isolated cell populations. *Anal. Biochem.*, **129**, 305–9 (1983).
 58. *Jennings B. R.* Electric field light scattering. In *Light scattering from polymer solutions* (ed. M. B. Huglin), pp. 527–79. Acad. Press, New York, 1972.
 59. *Jones M. N., Midgley P. J. W.* Low angle laser light scatter from surfactant solubilised biological macromolecules. Proc. 607th Meeting (“Lasers in Biochemistry”), *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 625–7 (1984).
 60. *Kerker M.* The scattering of light and other electromagnetic radiation. Academic Press, New York, 1969.
 61. *Klein R. A.* The measurement of motility in micro-organisms and its biochemical significance. Proc. 607th Meeting (“Lasers in Biochemistry”) *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 627–30 (1984).
 62. *Koch A. L.* Theory of the angular dependence of light scattering by bacteria and similar-sized biological objects. *J. Theoretical. Biol.*, **18**, 133–56 (1968).
 63. *Koch A. L., Ehrenfeld E.* The size and shape of bacteria by light scattering measurements. *Biochim. Biophys. Acta*, **165**, 262–73 (1968).
 64. *Korpel A.* Acousto-optics. In *Applied optics and optical engineering*, vol, VI, chapter 4, pp. 89–109. Academic Press, New York, 1980.

65. *Kreuger R.* The effect of low ionic strength on the circular dichroic spectrum of chromatin and nucleosomal subunits. *Arch. Biochem. Biophys.*, **23**(1), 183–8 (1984).
66. *Latimer P.* Light scattering and absorption as methods of studying cell population parameters. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **11**, 129–50 (1982).
67. *Mazer N. A.* Laser light scattering in micellar systems. In *Dynamic light scattering* (ed. R. Pecora), pp. 305–46. Plenum Press, New York, 1985.
68. *Milanovich F. P., Hirschfeld T. B., Wang F. T.* Clinical measurements using fibre optics and optrodes. In *Novel optical fibre techniques for medical applications*. SPIE, vol. 494, pp. 18–24, 1984.
69. *Fiber optic and laser sensors.* Moore E. L., Ramer O. G. (eds.). *Proceedings of SPIE*, Vol. 412, April 5–7, 1983, Arlington, Virginia, USA.
70. *Nagasawa M., Takahashi A.* Light scattering from polyelectrolyte solutions. In *Light scattering from polymer solutions* (ed. M. B. Huglin), pp. 672–723. Academic Press, New York, 1972.
71. *Nakadate S., Saito H.* Particle size distribution measurement using a Hankel transform of a Fraunhofer diffraction spectrum. *Optics Letts.*, **8**(11), 578–80 (1983).
72. *Newman J.* Dynamic light scattering as a probe of superhelical DNA-intercalating agent interaction. *Biopolymers*, **23**, 1113–19 (1984).
73. *Nicoli D. F., Dorshow R. W.* Effects of interparticle interactions on particle size determinations by QELS. In *Measurement of suspended particles by quasi-elastic light scattering* (ed. B. E. Dahneke), pp. 501–28. John Wiley, New York, 1983.
74. *Oakley D. M., Jennings B. R., Wateman D. R., Fahey R. C.* An electro-optic birefringence fine-particle sizer. *J. Phys. E.*, **15**, 1077–82 (1982).
75. *O'Shea D. C., Callen W. R., Rhodes W. T.* Introduction to lasers and their applications. Addison-Wesley, Mass., USA, 1979.
76. *Patterson G. D.* Dynamic light scattering in bulk polymers. In *Dynamic light scattering* (ed. R. Pecora), pp. 245–76. Plenum Press, New York, 1985.
77. *Dynamic light scattering: applications of photon correlation spectroscopy.* Pecora R. (ed.). Plenum Press, New York, 1985.
78. *Plasek J., Marik T.* Determination of undeformable erythrocytes in blood samples using laser light scattering. *Appl. Opt.*, **21**(23), 4335–8 (1982).
79. *Prescott B., Steinmetz W., Thomas G. J.* Characterization of DNA structure by laser Raman spectroscopy. *Biopolymers*, **23**, 235–56 (1984).
80. *Price C. P., Spencer K., Whicher J.* Light scattering immunoassay of specific proteins: a review. *Ann. Clin. Biochem.*, **20**, 1–14 (1983).
81. *Pusey P. N.* Detection of small polydispersities by photon correlation spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, **80**(8), 3513–20 (1984).
82. *Pusey P. N., Vaughan J. M.* Light scattering and intensity fluctuation spectroscopy. In *Dielectric and related molecular processes*, vol. 2, chapter 2, pp. 48–105. Chem. Soc. Specialist Periodical Report, 1975.
83. *Pusey P. N., Koppel D. E., Schaefer D. W., Camerini-Otero R. D., Koenig S. H.* Intensity fluctuation spectroscopy of laser light scattered by solutions of spherical viruses: R17, QB, BSV, PM2 and T7. I. Light scattering technique. *Biochemistry*, **13**(5), 952–60 (1974).
84. *Randall J. J., Vaughan J. M.* Brillouin scattering in systems of biological importance. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **A293**, 341 (1979).
85. *Salzman G. C., Gregg T. G.* Current and experimental methods of rapid microbial identification. *Biotechnology*, March, 243–8 (1984).
86. *Photon correlation techniques in fluid mechanics.* Schulz-DuBois E. O. (ed.). Springer Verlag, Berlin, 1983.
87. *Schmitz K. S., Lu M.* Quasielastic light-scattering studies on dinucleosomal-sized DNA: ionic-strength dependence. *Biopolymers*, **23**, 797–808 (1984).
88. *Sellen D. B.* The diffusion of compact macromolecules through biological gels. In *The application of laser light scattering to the study of biological motion* (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institute Series, vol. 59, pp. 209–220. Plenum Press, New York, 1983.
89. *Shogren R. L., Blackwell J., Jamieson A. M., Carrino D. A., Pechak D., Caplan A. I.* Light scattering studies of chick limb bud proteoglycan aggregate. *J. Biol. Chem.*, **258**(24), 14741–4 (1983).
90. *Sittampalam G., Wilson G. S.* Experimental observations of transient light scattering formed during immunoprecipitin reactions. *Anal. Chem.*, **56**, 2170–5 (1984).
91. *Sittampalam G.* Theory of light scattering measurements as applied to immunoprecipitin reactions. *Anal. Chem.*, **56**, 2176–80 (1984).
92. *Spendley D. G., Jones D. P., Smith A. T., Lloyd D. S., Cooke E. D.* Inexpensive laser Doppler instrument for cell electrophoresis. *Proc. Max Born Conf.*, 1982. SPIE, vol. 369, pp. 174–177.
93. *Steer M. W.* Vesicles. In *The application of laser light scattering to the study of biological motion* (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institute Series, vol. 59, pp. 359–66. Plenum Press, New York, 1983.

94. *Steer M. W.* Applications of laser light scattering to biological systems. In The application of laser light scattering to the study of biological motion (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institute Series, vol. 59, pp. 43–52. Plenum Press, New York, 1983.
95. *Steiner R., Ottmann O., Kaufmann R., Light P. A., Hoffmann W.* Cell electrophoresis: automatic measurements by light scattering with Lazypher. *Electrophoresis*, **6**, 82–9 (1985).
96. *Swithenbank J., Beer J. M., Taylor D. S., Abbot D., McCreath G. C.* A laser diagnostic technique for the measurement of droplet and particle size distribution. *Prog. Astronautics and Aeronautics*, **53**, 421–47 (1977).
97. *Tabor B. E.* Preparation and clarification of solutions. In *Light scattering from polymer solutions* (ed. M. B. Huglin), pp. 1–25. Academic Press, New York, 1972.
98. *Tanaka T.* Light scattering from polymer gels. In *Dynamic light scattering* (ed. R. Pecora), pp. 347–62. Plenum Press, New York, 1985.
99. *Theophanides T.* Infrared Raman spectroscopy of biological molecules. NATO Advanced Study Institute Series. D. Reidel, Dordrecht, Holland, 1979.
100. *Van de Hulst H. C.* Light scattering by small particles. Wiley, New York, 1957. (Also 1981, Dover Books.)
101. *Vaughan J. M.* Quasi-elastic light scattering from polymer solutions. In *Static and dynamic properties of the polymeric solid state* (eds. R. A. Pethrick, R. W. Richards), pp. 305–347. D. Reidel, Dordrecht, Holland, 1982.
102. *Volochine B.* Light scattering studies of biological populations. In The application of laser light scattering to the study of biological motion (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institute Series, vol. 59, pp. 635–656. Plenum Press, New York, 1983.
103. *Von Schulthess G. K., Cohen R. J., Benedek G. B.* Laser light scattering spectroscopic immunoassay in the agglutination–inhibition mode for human chorionic gonadotropin (hCG) and human luteinizing hormone (hLH). *Immunochemistry*, **13**, 963–6 (1976).
104. *Von Schulthess G. K., Sakato N., Bendek G. B.* Laser light scattering spectroscopic immunoassay for mouse IgA. *Immunochemistry*, **13**, 955–62 (1976).
105. *Vurek G. G.* *In vivo* chemical sensors. In *Novel optical fibre techniques for medical applications*. SPIE, vol. 494, pp. 2–6 (1984).
106. *Walters P. T.* Practical applications of inverting spectral turbidity data to provide aerosol size distributions. *Appl. Opt.*, **19**(14), 2353–65 (1980).
107. *Wang C.-C., Holland Cook K., Pecora R.* Dynamic light scattering studies of ribonuclease. *Biophysical Chem.*, **11**, 439–42 (1980).
108. *Wang R. C., Chen S. H.* Chemotaxis and band formation of *Escherichia coli* studies by light scattering. In The application of laser light scattering to the study of biological motion (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institute Series, vol. 59, pp. 607–28. Plenum Press, New York, 1983.
109. *Ware B. R.* Electrophoretic light scattering: modern methods and recent applications to biological membranes and polyelectrolytes. In The application of laser light scattering to the study of biological motion (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institute Series, vol. 59, pp. 89–122. Plenum Press, New York, 1983.
110. *Williams D. J.* Organic polymeric and non-polymeric materials with large optical nonlinearities. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **23**, 690–703 (1984).
111. *Wiltzius P.* Light scattering study on polydisperse TMV solutions. *Appl. Opt.*, **21** (11), 2022–6 (1982).
112. *Wyatt P. J.* Differential light scattering techniques for microbiology. In *Methods in microbiology* (ed. J. R. Norris), vol. 7A, chapter 6, pp. 183–263. Academic Press, New York, 1975.
113. *Wyatt P. J.* Atlas of the light scattering characteristics of microparticles. Science Spectrum Inc., Santa Barbara, Calif., USA, 1975.
114. *Yamaoka K., Matsuda K.* Electric dipole moments of DNA in aqueous solutions as studied by the reversing-pulse electric birefringence. *Macromolecules*, **13**, 1558–60 (1980).
115. *Yamaoka K.* Electric dichroism study of a sonicated DNA and its complex with an acridine dye in aqueous solutions: Field–strength dependence and linear dichroic spectra. *Macromolecules*, **14**, 595–601 (1981).
116. *Yamaoka K., Yueda K.* Reversing-pulse electric birefringence study of helical poly(β -1-glutamic acid) in N,N-dimethylformamide with emphasis on a new data analysis for the polydisperse system. *J. Phys. Chem.*, **86**, 406–13 (1982).
117. *Yariv A.* Quantum electronics. Wiley, New York, 1975.
118. *Yu H.* Structure and dynamics of disc membrane vesicles. In The application of laser light scattering to the study of biological motion (eds. J. C. Earnshaw, M. W. Steer). NATO Advanced Science Institute Series, vol. 59, pp. 367–382. Plenum Press, New York, 1983.

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОПРОЦЕССОРОВ

Глава 35

Использование микропроцессоров для повышения эффективности анализа при помощи ферментных сенсоров

Даниэль Тевено, Тьерри Теллагранд, Роберт Стернберг

35.1. Введение

Биосенсоры, такие, как ферментные электроды, включающие ферментные мембраны и электрохимические детекторы, обладают высокой специфичностью к определенному метаболиту, например сахару или аминокислоте [9, 15, 16]. Рабочие и аналитические характеристики биосенсоров зависят от большого числа физических, химических и биохимических параметров (конкретно, свойств фермента) [10], которые нередко трудно выявить. При разработке биосенсорных устройств некоторые группы исследователей использовали программируемые калькуляторы и микрокомпьютеры [3, 5, 8, 19]. В Японии запатентован ряд разработок, связанных с автоматизацией ферментных сенсоров при помощи микрокомпьютеров или микропроцессоров [4, 6, 7, 18]. Что касается более узкой области ферментных электродов, то и здесь вычислительная техника может быть весьма полезна – во-первых, при изучении и оптимизации аналитических характеристик сенсоров, особенно правильности, воспроизводимости, диапазона определяемых концентраций [2], во-вторых, для прямого или косвенного определения тех параметров, которые играют важную роль в формировании сигнала сенсора [1, 13].

В данной главе описано использование программируемых калькуляторов и микрокомпьютеров для улучшения аналитических характеристик амперометрических глюкозных электродов [12].

35.2. Материалы и методика работы

35.2.1. Ферментные электроды

Все использованные в данной работе ферментные электроды включали глюкозооксидазные (GOD) мембраны, находящиеся в тесном контакте с платиновым диском. Ферментные мембраны получали либо ацилазидной активацией реконструированных коллагеновых пленок [16], либо помещая фермент между ацетилцеллюлозными пленками [11]. В последнем случае мембрану изготавливали в лаборатории. Исходный раствор содержал 5% диацетилцеллюлозы, 91,5% ацетона, 1% поливинилпирролидона, 2,5% воды; 5 мг глюкозооксидазы (ЕС 1.1.3.4, фирма Boeringer, марка II) растворяли в 3 мл ацетатного буферного раствора. Изготовление мембраны включало ряд стадий: 3 мл ацетилцеллюлозного раствора перемешивали с 0,2 мл ферментного раствора в течение 5 мин; затем с помощью распылителя (5, 15 или 30 мкм) смесь наносили на стеклянную пластинку, чтобы получилась тонкая пленка. После высушивания (2–5 мин) мембрану промывали дистиллированной водой и хранили в ацетатном буферном растворе (рН 5,6).

Электрохимические измерения проводили, используя потенциостат PRGDEL (фир-

ма Solea) и усилитель тока, соединенный с ленточным самописцем. В дифференциальной системе, т. е. когда ферментный и не содержащий фермента электроды одновременно находились в исследуемом растворе (перемешиваемом или в проточной системе), оба рабочих электрода соединяли с дифференциальным усилителем тока DELTAPOL (Solea), связанным с потенциостатом. Эта установка позволяла измерять разность токов – соответствующего ферментативной реакции (I_1) и фонового (I_2) – и вычислять разность $I_1 - kI_2$, где k менялось от 0,5 до 2 [16]. При необходимости получения первой и второй производной сигналов использовали аналоговый дифференцирующий усилитель Derivol и односекундный генератор развертки (Solea).

Электроды монтировали либо в корпусах модифицированных газовых электродов, погруженных в термостатируемый перемешиваемый раствор [16], либо в модифицированных электрохимических ячейках для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (DEL-1, Solea Tacussel). Последние состоят из двух полиэтиленовых модулей, разделенных тефлоновой прокладкой. Первый модуль имеет отверстие для входа и выхода жидкости, второй же включает два платиновых электрода (рабочий и вспомогательный) и электрод сравнения (Ag/AgCl, насыщенный раствор KCl). В середине тефлоновой прокладки проделано отверстие, обеспечивающее циркуляцию жидкости и определяющее объем реакционной камеры (0,02 мл). Содержащую фермент ацетилцеллюлозную мембрану в данной ячейке помещали между электродами и тефлоновой прокладкой. Раствор через ячейку прокачивали при помощи перистальтического насоса (модель Minipuls II, Gilson), скорость потока составляла от 0,1 до 2 мл/мин.

35.2.2. Программируемый настольный калькулятор для ферментного электрода

Для улучшения линейности и воспроизводимости сенсоров глюкозы к указанному выше оборудованию подключали программируемый настольный калькулятор 97S фирмы Hewlett Packard [2]. Двоично-десятичные вход и четыре выхода калькулятора соединяли с потенциостатом и электрической бюреткой через цифровой милливольтметр Solea Ionamate (диапазон ± 2000 мВ, точность 0,1 мВ), как показано на рис. 35.1. Разработанная нами программа выполняла две основные функции: 1) определение стационарного сигнала путем измерения установившихся выходных токов до и после введения исследуемого раствора в реакционную ячейку с погруженными электродами, а также вывод соответствующих значений на печатающее устройство; 2) управление

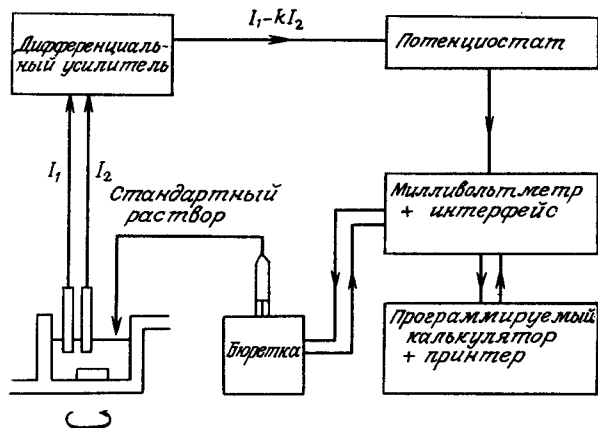


Рис. 35.1. Блок-схема автоматизированного ферментного электрода с использованием программируемого калькулятора [14].

выводом стандартных добавок глюкозы из электрической бюретки Solea EBX с интерфейсом EBX-INT и статический анализ совокупности значений (1–50) отклика сенсора на одинаковую по величине добавку с выводом на печатающее устройство каждого значения сигнала, а также среднего значения, стандартного отклонения и коэффициента вариации.

Для определения неизвестных концентраций глюкозы эту программу модифицировали, заменив вторую стадию автоматической градуировки сенсора по двум последовательно вводимым добавкам стандартного раствора глюкозы. Концентрацию глюкозы в исследуемых растворах вычисляли, исходя из отклика сенсора на вторую стандартную пробу. Для проверки мешающего влияния была разработана специальная процедура. После нескольких анализов образцов в ячейку снова вводили стандартный раствор глюкозы и распечатывали величину изменения сигнала.

35.2.3. Микрокомпьютер для ферментного электрода

Упомянутый выше калькулятор не может хранить в памяти более 26 переменных и, следовательно, не позволяет хранить кривые отклика сенсора целиком. Поэтому был разработан вариант установки с использованием микрокомпьютера Apple II (64 К) (рис. 35.2). Соединенный с потенциостатом интерфейс сбора данных состоял из 12-битового 16-канального четырехдиапазонного АЦП (GD 16V 12B 4G) и 8-битового ЦАП с программируемым смещением (GD Offset Prog). Сбором данных управляли через IRQ-прерывания, генерируемые программируемым таймером (CCS 7440A). Точное время начала экспериментов фиксировали при помощи электронных часов с батарейным питанием (Mountain Hardware Apple Clock). Электрическую бюретку EBX Solea подключали к микрокомпьютеру через интерфейсную плату с восемью TTL-входами и восемью реле (MID CR8C).

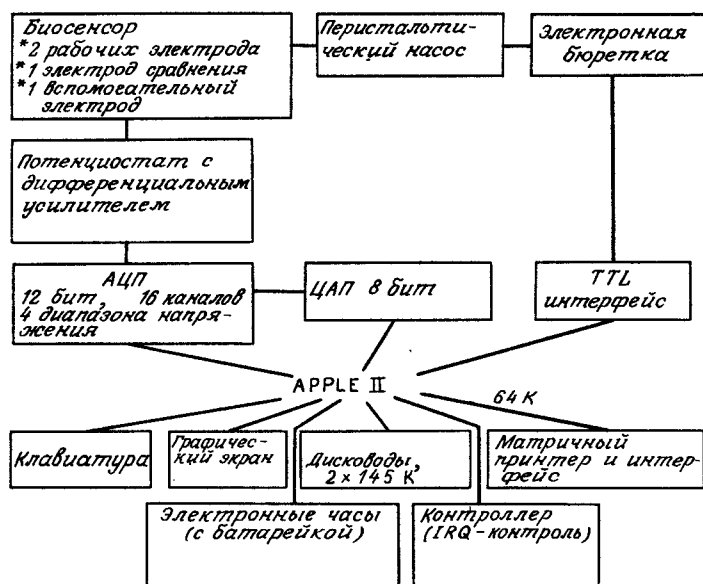


Рис. 35.2. Блок-схема автоматизированного ферментного электрода на базе микрокомпьютера.

35.2.4. Отклик электродов

При введении пробы, содержащей глюкозу, в 0,2 М ацетатный буферный раствор, 0,1 М по KCl (рН 5,7), омывающий оба электрода или циркулирующий через модифицированную ячейку для ВЭЖХ, можно регистрировать зависимость тока от времени в различных вариантах:

1. I_2 – выходной ток неферментного компенсирующего электрода E_2 . I_2 представляет собой фоновый сигнал и обычно очень мал, за исключением случаев, когда проба содержит вещества, восстанавливающиеся электрохимически (аскорбат, урат, сульфит и т. д.), и если ГОД-мембрана не обладает избирательной проницаемостью (реконструированная коллагеновая пленка).

2. $I_1 - kI_2$ с k , близким к 1, что соответствует детектированию образующегося в ферментативной реакции пероксида водорода. Величина $I_1 - kI_2$ достигает стационарного значения через 2–3 мин (в случае коллагеновых пленок толщиной 0,3–0,5 мм) или через 0,5–3 мин (ацетилцеллюлозные пленки толщиной 0,005–0,025 мм). Предельное значение $I_1 - kI_2$, очевидно, представляет собой стационарный сигнал сенсора.

3. Производная $(I_1 - kI_2)/dt$ достигает максимума через 20–50 с (коллаген) или 10–60 с (ацетилцеллюлоза). Высота этого пика характеризует динамический отклик сенсора.

Таким образом, можно одновременно получить три различные зависимости тока от времени, которые обычно регистрируют при помощи трехканального самописца Li-near 395. При отсутствии компенсирующего электрода E_2 регистрировали только кривые I_1 и dI_1/dt . На калькулятор или микрокомпьютер подавали выходные сигналы в форме $I_1 - kI_2$ либо I_1 и I_2 .

35.2.5. Оценка аналитических характеристик сенсоров

Методы оценки аналитических характеристик различны для погружаемых в раствор сенсоров и проточных систем.

В первом случае глюкозооксидазный и компенсирующий электроды погружали в 20 мл термостатируемого перемешиваемого буферного раствора или помещали в стенку ячейки с рабочим объемом 1–5 мл. Все анализы проводили, добавляя в ячейку небольшие порции исследуемого или стандартного раствора глюкозы. Перед опытами буферные растворы насыщали воздухом при заданной температуре, т. е. 30 или 37 °С. Фоновый ток измеряли в буферном растворе после поляризации рабочих платиновых электродов в течение 0,5–2 ч. Построение градуировочной кривой, нахождение линейного участка и оценку воспроизводимости проводили одновременно, добавляя в реакционный сосуд от 10 до 50 раз одинаковое количество стандартного раствора глюкозы. Добавку вводили с помощью электрической бюретки после того, как калькулятором детектировался постоянный токовый сигнал, т. е. когда сигнал от каждой предыдущей добавки достигал стационарного значения. Измеренные сигналы обрабатывали, либо сравнивая стационарный ток с фоновым током $I_{\text{ф}}$ перед каждой добавкой глюкозы, либо вычитая стационарный ток, соответствующий предыдущей добавке. Таким образом получали кривые в координатах либо $(I - I_{\text{ф}}) - C$, либо $\Delta I / \Delta C - C$ (где C – общая концентрация глюкозы в реакционном сосуде).

При использовании проточной ячейки через сенсор прокачивали буферный раствор, либо содержащий, либо не содержащий глюкозу. В обоих случаях растворы предварительно тщательно термостатировали и насыщали воздухом при температуре опыта (37 °С). Градуировку, оценку диапазона линейности и воспроизводимости проводили, как указано выше, сливая выходящий раствор в емкость для хранения.

35.3. Автоматизация ферментных глюкозных электродов с помощью программируемого калькулятора

При определении аналитических свойств фермента в стандартных растворах обычно требуется точная и тщательная проверка как самого электронного оборудования, так и всей системы, включая биосенсор, электронные устройства, регистрирующие приборы и дисплеи. Потенциостат, дифференциальный усилитель тока и дифференцирующий усилитель тока, использовавшиеся в данной работе, характеризуются хорошей точностью, линейностью, воспроизводимостью и низким дрейфом. Однако трехканальный самописец имеет неважную воспроизводимость – коэффициент вариации (CV) составляет 1,73% для 50 последовательных измерений на эквивалентной ячейке [2]. Программируемый калькулятор, на который выходные сигналы подаются через двоично-десятичный интерфейс и милливольтметр, отличается значительно лучшей воспроизводимостью ($CV = 0,64\%$ для 50 измерений). Таким образом, при оценке воспроизводимости всего прибора целесообразно использовать как калькулятор, так и графопроектор.

Для одновременного измерения фонового тока I_{ϕ} и градуировки прибора можно последовательно вводить добавки стандартного раствора глюкозы и измерять стационарный ток до и после каждой добавки. Эти стационарные токи находят либо непосредственно по регистрируемой самописцем токовой кривой, либо с помощью калькулятора, если дрейф сигнала меньше порога чувствительности (обычно 0,2 нА/мин). Кроме определения стационарного тока, калькулятор способен выполнять еще две функции: 1) контролировать работу электрической бюретки, вводящей добавки стандартного раствора глюкозы в ячейку с сенсорными электродами; 2) вычислять и выводить на печать средние значения и коэффициенты вариации для нескольких одинаковых добавок стандарта. Таким образом, весь эксперимент можно проводить без остановок, причем точно и воспроизводимо (рис. 35.1).

Распечатанные данные и записанные самописцем кривые можно представить в виде градуировочных графиков, т.е. зависимостей $I - I_{\phi}$ от C . На рис. 35.3 представлены типичные результаты эксперимента, в котором к 15 мл ацетатного буферного раствора 15 раз добавляли по 50 мкл 5,55 мМ раствора глюкозы. Уравнения линейной регрессии имеют следующий вид: для стационарных сигналов, регистрируемых самописцем,

$$I(A) = 1,87 \cdot 10^{-3} C - 2,09, \quad r^2 = 0,99945;$$

для стационарных сигналов, выводимых на печать,

$$I(A) = 1,60 \cdot 10^{-3} C - 1,71, \quad r^2 = 0,99949,$$

где C – концентрация глюкозы (моль/л) в реакционном сосуде. Сами по себе эти кривые

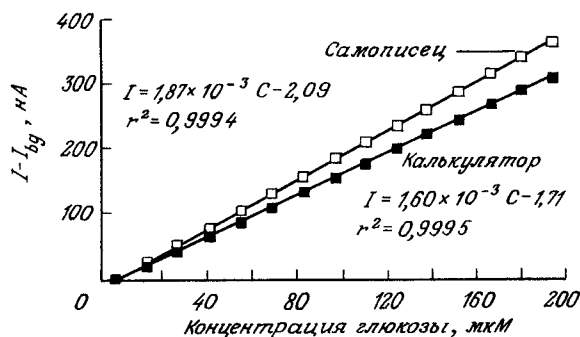


Рис. 35.3. Градуировочные кривые ферментного электрода, полученные при последовательном введении 15 добавок стандартного раствора глюкозы. Величину сигнала находили с помощью самописца (\square) и программируемого калькулятора (\blacksquare). GOD-коллагеновая мембрана; $30,0 \pm \pm 0,1^\circ\text{C}$; порции по 50 мкл 5,55 мМ раствора глюкозы вводили в 20 мл ацетатного буферного раствора [2].

не позволяют находить диапазон линейности с достаточной точностью, поэтому мы предпочитаем строить графики зависимости увеличения стационарного тока от приращения концентрации глюкозы в ячейке, т. е. ΔI от ΔC . Во всех опытах такие графики характеризуются лучшими диапазоном линейности и воспроизводимостью, если их строят по данным, рассчитанным с помощью калькулятора: например, для 15 последовательных значений сигнала, полученных с помощью калькулятора и самописца, коэффициенты вариации равны 6,5 и 8,0% соответственно. Почти во всех измерениях подобного рода отклик сенсора на первую добавку глюкозы оказывается значительно меньше, чем на последующие. Поэтому при анализе растворов с неизвестным содержанием глюкозы методом добавок мы предпочитаем в качестве опорной точки для расчета уравнения градуировочной кривой использовать сигнал сенсора при введении второй добавки глюкозы. С помощью дифференцирующего усилителя тока можно также регистрировать максимум первой производной dI/dt . Эта величина, характеризующая динамический отклик сенсора, пропорциональна приросту концентрации глюкозы и обычно имеет лучшую воспроизводимость, чем регистрируемый самописцем стационарный сигнал ($CV = 5,7\%$ для 15 измерений).

Такой автоматизированный глюкозный электрод позволяет быстро охарактеризовать сенсоры, изготовленные из различных ферментных мембран, электродов и измерительных ячеек, не прибегая к трудоемким и длительным процедурам построения и обработки графиков. Очевидно, например, что усиленное перемешивание буферного

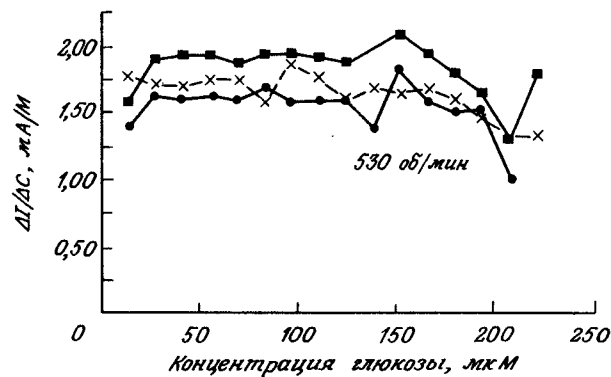
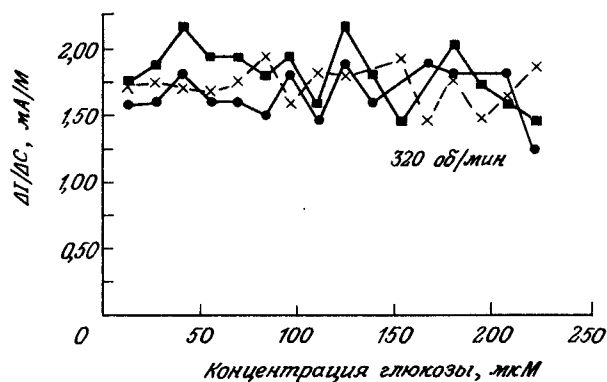


Рис. 35.4. Сравнение воспроизводимости сигнала сенсора при последовательном введении 16 добавок стандартного раствора глюкозы в 20 мл буферного раствора при различных условиях перемешивания (скорость вращения стержневой мешалки длиной 1 см 320 и 530 об/мин). Остальные условия те же, что и на рис. 35.3. Показаны стационарные сигналы, полученные при помощи самописца (■) и калькулятора (×); ● — динамический отклик, зарегистрированный самописцем.

раствора улучшает воспроизводимость стационарных сигналов (рис. 35.4): увеличение скорости вращения мешалки (1 см) с 320 до 530 об/мин приводит к некоторому уменьшению наклона стационарной градуировочной кривой от 1,7 до 1,6 мА/М и существенно уменьшает коэффициент вариации для стационарного тока – с 9,4 до 2,0% ($n = 8$). Таким образом, необходимо более четкое определение гидродинамических условий вблизи ферментной мембраны. С этой целью была испытана проточная ячейка, созданная на основе электрохимического детектора для ВЭЖХ. Альтернативой такой гидродинамической ячейки является вращающийся мембранный электрод, в котором толщину диффузионного слоя можно определить с высокой точностью; такая установка особенно удобна для определения проницаемости и коэффициентов диффузии ферментных мембран [1].

Поскольку с ростом общей концентрации и величины токов возрастает и уровень шума, воспроизводимость величины $\Delta I / \Delta C$ для первой добавки стандартного раствора лучше, чем для последующих: например, для первых восьми добавок стандартных растворов глюкозы $CV = 2,0\%$, тогда как для последующих семи добавок $CV = 10,9\%$ (рис. 35.4, б, стационарный сигнал, расчет на калькуляторе). Таким образом, при использовании ферментного сенсора в ячейке с перемешиванием, в которую вводят как стандартный, так и исследуемый растворы, для поддержания воспроизводимости на должном уровне необходимо менять буферный раствор и промывать сенсор достаточно часто.

Описанная установка дает возможность оценивать аналитические характеристики стационарных сигналов, но не позволяет обрабатывать нестационарные значения сигналов и хранить в памяти кривые отклика сенсора целиком для последующего более детального изучения. Поэтому мы разработали более мощный прибор, в котором для хранения и обработки данных используется микрокомпьютер.

35.4. Использование микрокомпьютера для автоматизации ферментных глюкозных электродов

35.4.1. Разработка автоматизированного устройства для оценки параметров ферментного электрода

Персональные микрокомпьютеры имеют значительно большие возможности для хранения и обработки данных, чем любые настольные калькуляторы. Для повышения точности преобразования аналогового сигнала в цифровой описанный выше калькулятор с интерфейсом в виде цифрового милливольтметра можно заменить на выпускаемый серийно 12-битовый АЦП, связанный с 8-битовым ЦАП с программируемым смещением (рис. 35.2). Если в предыдущей установке скорость сбора данных была фиксирована при максимальном значении, соответствующем частоте 0,5 Гц, то система с микрокомпьютером обеспечивает более точный и гибкий контроль скорости сбора данных: последнее достигается с помощью контроллера сбора данных, управляемого таймерной платой, содержащей три связанных 16-битовых счетчика. Бюретка, контролируемая платой с TTL-входами и реле, вводит в ячейку заданные объемы стандартного раствора глюкозы.

Разработанное для данного случая программное обеспечение использует два входных канала, связанные соответственно с ферментным (E_1) и компенсирующим (E_2) электродами. Как показано на рис. 35.5, программное обеспечение, организуемое в единую систему иерархической системой меню, включает несколько программ с общим файлом параметров. В зависимости от требуемого для каждой из этих программ быстрого действия использовали либо машинный язык 6502, либо компилируемый Бейсик. Например, в ходе установочной процедуры диалоговая скомпилированная

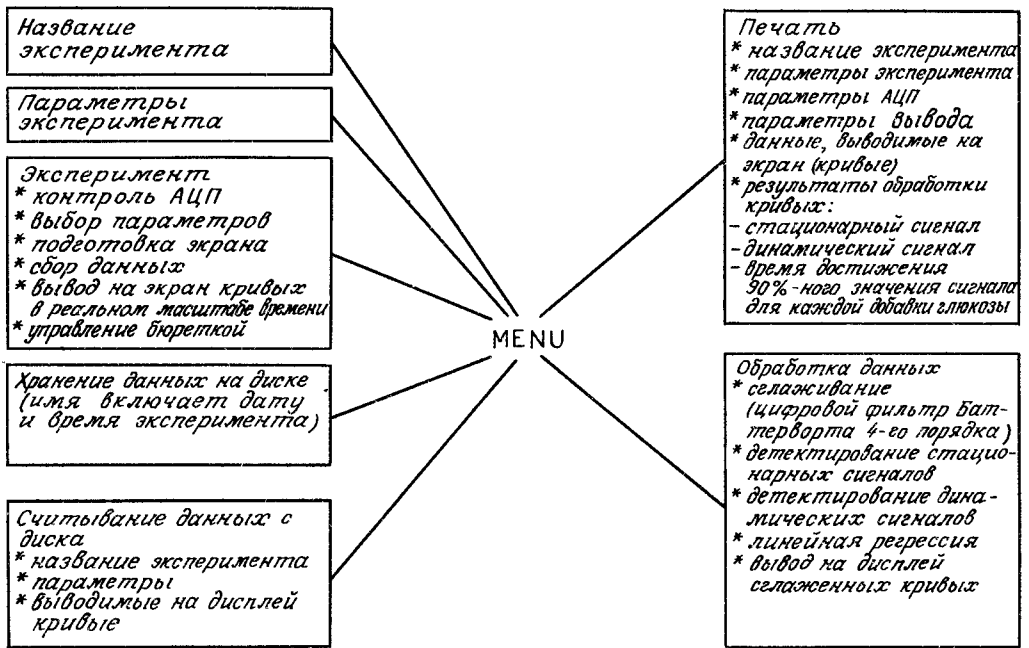


Рис. 35.5. Блок-схема программного обеспечения микрокомпьютера Apple II, обслуживающего автоматизированные ферментные электроды.

программа на Бейсике обеспечивает сохранение всех экспериментальных параметров, в частности номеров опытов, диапазонов потенциалов (± 20 , ± 100 , ± 1500 или ± 2500 мВ); единиц измерения сигнала (нА или мА), диапазонов изменения значений (например, 200 нА при 5000 мВ), частот опроса числа вводимых значений (меньше 2000) в виде файла с прямым доступом.

Программа эксперимента состоит из нескольких взаимосвязанных скомпилированных программ на Бейсике, при выполнении которых:

- 1) проводится проверка АЦП на дрейф нулевого уровня;
- 2) смещение на обоих каналах оптимизируется с тем, чтобы до начала эксперимента уменьшить фоновые сигналы;
- 3) готовится экран дисплея высокого разрешения, и оси координат для графиков размечаются в выбранных пользователем единицах;
- 4) регистрируются и передаются на хранение в файл параметров дата и время начала эксперимента;
- 5) таймер генерирует IRQ-прерывания с заданной частотой;
- 6) при нажатии соответствующей кнопки инициируется процедура опроса.

Кроме того, имеется несколько программ, написанных на машинном языке, которые:

- 1) контролируют сбор данных по обоим каналам;
- 2) сохраняют в памяти старшие и младшие байты численных значений;
- 3) выводят на дисплей высокого разрешения точки, соответствующие обоим каналам.

Процедура сбора данных и вывода кривых на дисплей в режиме реального времени лимитируется не временем выполнения этих программ, а постоянными времени АЦП и

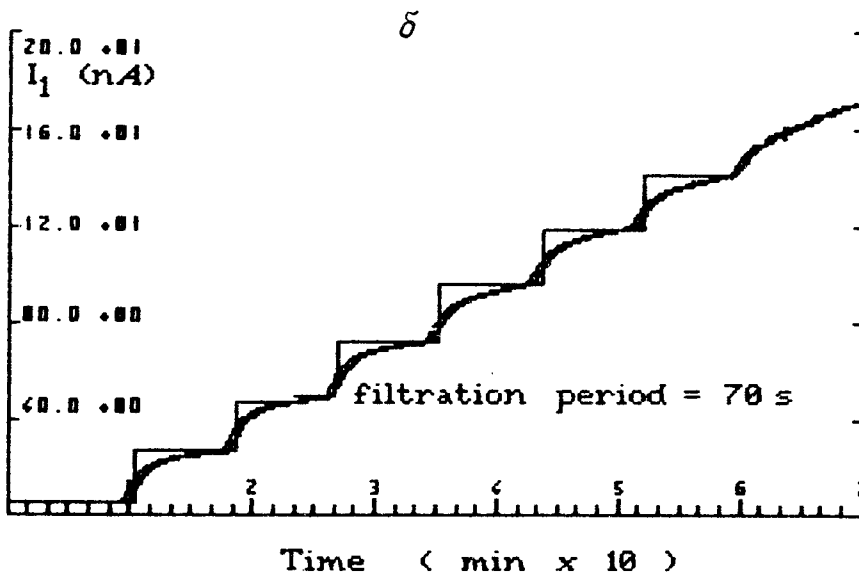
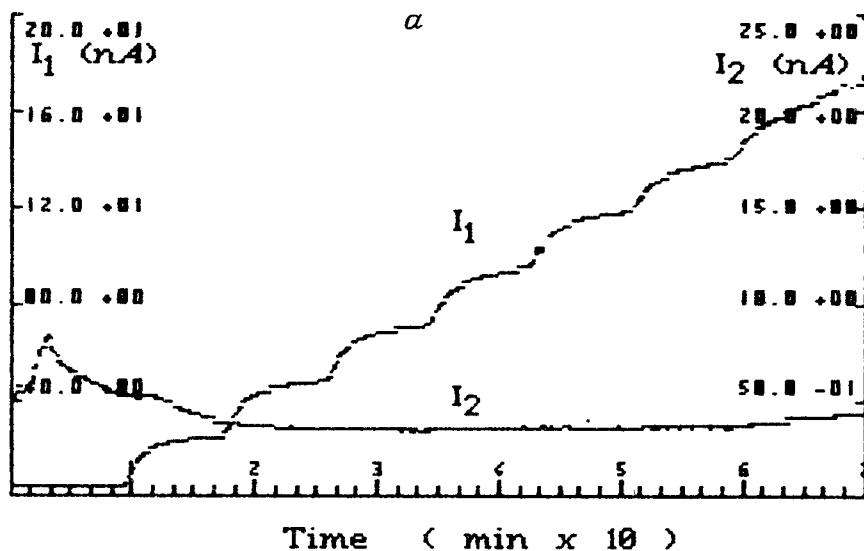


Рис. 35.6. Распечатанная на матричном принтере копия изображения на дисплее высокого разрешения, полученного в опытах по проверке линейности отклика проточного глюкозного электрода при высокой концентрации глюкозы: экспериментальные (а) и расчетные (б) кривые отклика сенсора на ступенчатое (по 5 мМ) увеличение концентрации глюкозы. Сглаживание экспериментальных кривых при обработке проводили с помощью цифрового фильтра с постоянной времени 70 с. GOD-ацетилцеллюлозная мембрана; $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; семь порций по 30 мкл 0,5 М раствора глюкозы вводили через каждые 500 с в 3 мл ацетатного буфера, циркулирующего в замкнутом контуре.

ЦАП. Для выпускаемых серийно приборов требуется около 30 мс, если потенциалы и уровни сдвигов для каждого из каналов различны. При использовании одноканальной системы частота опроса составляет 2,5 кГц, а при выводе кривой на дисплей в конце опыта она достигает 15 кГц. Наконец, введение заданных объемов стандартного раствора с определенной периодичностью может осуществляться с помощью программы на машинном языке, контролирующей шаговый двигатель бюретки и пересчитывающей вводимый объем в TTL-сигналы.

Результаты могут храниться на диске пользователя в виде двух файлов – данных параметров; именем файла служит дата и время начала опыта. Предыдущий опыт может быть вызван также путем считывания из соответствующих файлов экспериментальных параметров и данных и выведен на дисплей высокого разрешения.

Для сохранения хода каждого эксперимента все параметры, включая нули и сдвиги АЦП, реальную картину на дисплее, необработанные или обработанные кривые и результаты обработки данных, можно распечатать на матричном принтере (рис. 35.6, а).

Последним компонентом этой автоматизированной системы является блок обработки данных, представляющий собой ряд взаимосвязанных компилированных программ на Бейсике. Эти программы, размещаемые на второй стороне программного диска, выполняют ряд, операций обработки предварительно записанных данных:

- 1) с помощью цифрового фильтра Баттерворта 4-го порядка сглаживаются сигналы с частотой выше порогового значения, выбираемого пользователем,
- 2) по сглаженным данным определяются стационарные сигналы (наклон кривой должен быть меньше задаваемого пользователем); с помощью линейной регрессии находятся уравнения этих почти горизонтальных частей кривых и затем рассчитывается значение стационарного сигнала, т. е. ΔI ;
- 3) при достижении максимума первой производной сглаженной кривой рассчитывается соответствующий динамический сигнал $(dI/dt)_{\max}$;
- 4) сглаженные кривые, точки перегиба и стационарные значения выводятся на экран (рис. 35.6, б), так что все указанные выше операции контролируются пользователем.

Одновременно создается файл, содержащий все стационарные и динамические значения сигналов (в единицах пользователя), а также все постоянные времени этих сигналов. Пользователь имеет возможность либо убедиться в достоверности этих данных и хранить их в виде соответствующего файла параметров, либо исключить нежелательные значения, либо подвести итоги всей процедуры обработки данных.

Наконец, имеется пакет программ для чтения всех параметров и данных из упомянутых выше файлов и хранения данных, зарегистрированных по обоим каналам, и соответствующих им значений времени. При этом формат обмена данными, используемый в большинстве коммерческих прикладных программ, реализуется в виде рабочих бланков, позволяющих проводить любые систематические вычисления либо по всем данным, либо по выбору экспериментатора.

35.4.2. Оценка характеристик глюкозного электрода при помощи автоматизированного устройства

С помощью описанных выше установки и программного обеспечения проведено большое число повторных опытов с целью сравнения различных GOD-мембран и электродов. На рис. 35.6 показаны типичные результаты опытов по проверке воспроизводимости и линейности при высоких концентрациях глюкозы. Ферментную ацетилцеллюлозную мембрану размещали в проточной ячейке. При ступенчатом увеличении концентрации глюкозы (7 раз по 5 мМ) получают стационарные сигналы, приведенные на рис. 35.6, а. Уровни этих сигналов, определенные с помощью программы

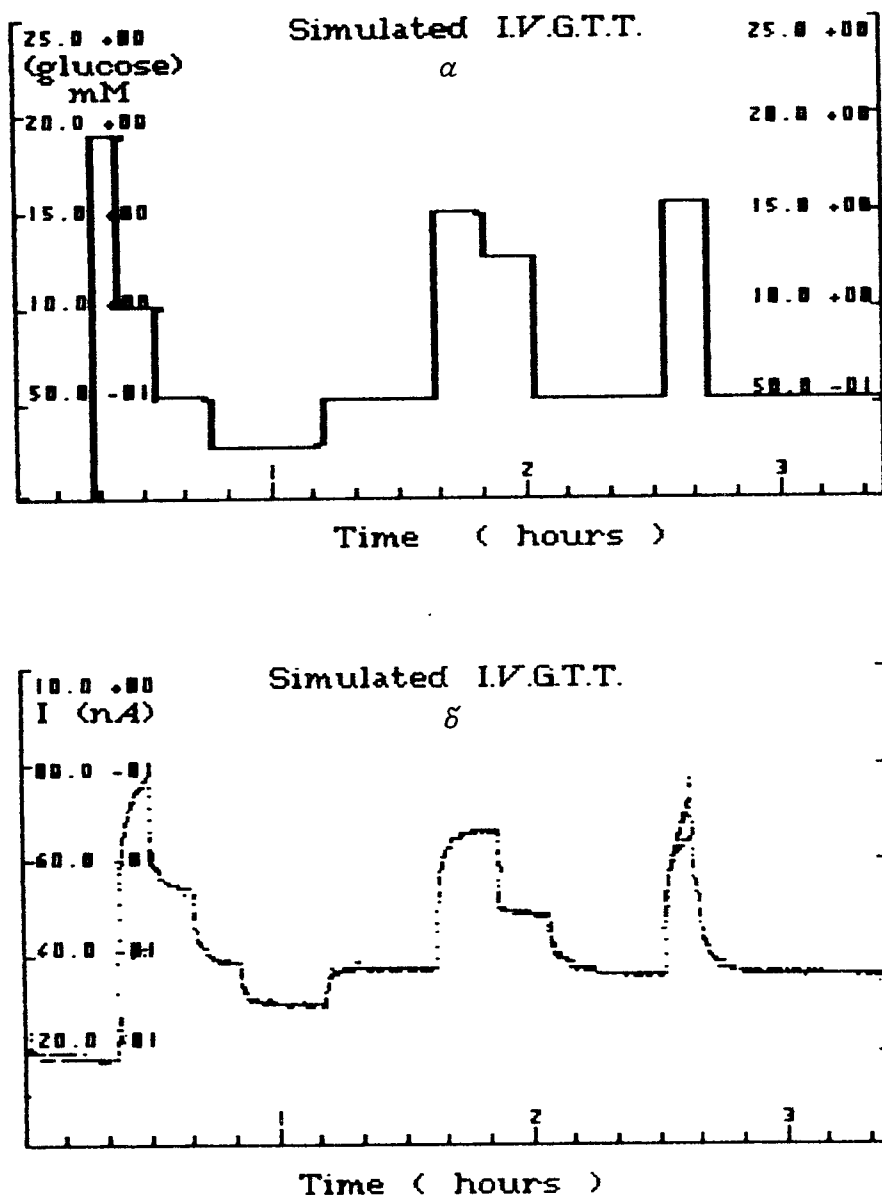


Рис. 35.7. Распечатанная на матричном принтере копия изображения на дисплее высокого разрешения, полученного в опытах с проточным электродом в условиях, моделирующих тест на допустимую внутривенную концентрацию глюкозы (IVGTT): а – изменение концентрации глюкозы при различных физиологических состояниях; б – отклик глюкозного электрода на эти изменения. GOD-ацетицеллюлозная мембрана; $37,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$; концентрацию глюкозы изменяли в пределах от 0,2 до 19 мМ, добавляя в ацетатный буферный раствор, циркулирующий в замкнутом контуре, либо стандартный раствор глюкозы, либо буферный раствор.

обработки данных, находятся в пределах от 21,9 до 23,7 нА (рис. 35.6, б) при периоде фильтрования данных 70 с; соответствующий динамический сигнал находится в диапазоне от 21,7 до 24,4 нА/с и свидетельствует о линейности сигнала глюкозного сенсора вплоть до концентрации глюкозы 30 мМ.

В процессе испытаний глюкозных сенсоров изучали также их отклик на концентрацию глюкозы во времени. На рис. 35.7, а представлены такие кривые для модельных тестов на допустимую внутривенную концентрацию глюкозы при различных кинетических схемах. Очевидно, что такое устройство реагирует на увеличение и уменьшение уровня глюкозы, но время достижения стационарного сигнала в таких случаях может быть слишком велико.

Как показали опыты на бодрствующих крысах с внешним кровяным шунтом, такие мембраны в принципе пригодны для определения глюкозы *in vivo* [17], однако значения их сигналов относительно малы (от 1 до 10 мкА·М⁻¹·мм²), а времена отклика иногда слишком велики (от 0,4 до 3 мин). Проводятся опыты по созданию глюкозных сенсоров, градуировочный график для которых также линеен при высоких концентрациях глюкозы, но с большей амплитудой выходного сигнала и меньшими временами отклика.

35.5. Выводы

Достоверное описание любого сенсора и особенно биосенсоров, например ферментных электродов, предполагает большое число анализов с линейными и воспроизводимыми результатами, а также обработку соответствующих стационарных и динамических сигналов. Фактически с одной и той же реконструированной коллагеновой мембраной за период до четырех месяцев подряд при рабочей температуре 30 °С и хранении ее при комнатной температуре было проведено несколько тысяч анализов на глюкозу [14]. Постановка такого большого числа опытов была бы невозможной без автоматизации как при введении в сенсор от 10 до 50 добавок стандартного раствора глюкозы, так и при детектировании стационарных сигналов и их статистической обработки. В этой главе описаны две различные установки для такой автоматизации ферментных сенсоров. С одной стороны, все указанные функции выполняет простой программируемый калькулятор, причем с точностью нередко лучшей, чем достигается в обычных опытах с использованием диаграммного самописца. С другой стороны, значительный интерес может представлять хранение всей кривой отклика сенсора и последующий анализ ее формы – ситуация, когда увеличение концентрации субстрата происходит постепенно, часто встречается в промышленных и клинических условиях. Вторая установка с микрокомпьютером и серийными платами позволяет как собирать данные и выводить их на дисплей высокого разрешения, так и проводить разного рода обработку данных. В настоящее время эта установка используется в нашей лаборатории для сравнения основных аналитических параметров различных ферментных мембран и ячеек, а также для записи и обработки результатов анализов, проводимых с помощью глюкозных сенсоров *in vivo* на бодрствующих животных, находящихся в различных физиологических состояниях [17].

Благодарность

Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs salariés (Франция), грант CNAMTS-INSERM 85.3.54.8.E, National Institute of Health (США), грант AM30718, Association des Jeunes Diabetiques (Париж, Франция).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Dubois C.* Electrochemical characterization of membranes used in enzyme electrodes. Research report, Université Paris - Val de Marne, 1984, 42 pp.
2. *De Laforcade V.* Study of a table set-up for glucose determination with an enzyme-based electrode. Research report, Université Paris - Val de Marne, 1980, 106 pp.
3. *Jaenchen M., Scheller F., Pfeiffer D., Pittelkow R., Wiegand P., Nentwig J.* GKM 01: a new measuring instrument for glucose using enzyme electrodes. *Z. Med. Laboratoriumsdiagn.*, **23**(1), 39-42 (1982).
4. *Kawana S., Nihira K., Miyashiro H., Takada Y.* Analyzer using immobilized enzymes. *Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 55/10523 (80/10523)*, 25 Jan 1980, 3 p. Appl. or Pr. 78/83098, 10 Jul 1978.
5. *Kernez J. P., Konate L., Romette J. L.* Determination of substrate concentrations by a computerised enzyme electrode. *Biotechnology and Bioengineering*, **25**, 845-55 (1983).
6. *Kyoto Daiichi Kagaku K. K.* Apparatus for automatic and continuous analysis of blood. Patent Belg. BE 892964 A1, 16 g 1982, 50 p. Appl. 2079, 26 Apr 1982; JP Appl. 81/63160, 24 Apr 1981; JP Appl. 81/150924, 9 Oct 1981.
7. *Mitsubishi Rayon Co. Ltd.* Automatic electrode apparatus for determination of biological components. *Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 58/135950 A2 (83/135950)*, 12 g 1983, 4 p., Appl. 82/18477, 8 Feb 1982.
8. *Skogberg D., Richardson T., Blaszczak T.* Automatic sampling and monitoring of potentiometric electrodes: steady-state response by first and second derivative techniques. *Anal. Chem.*, **51**(12), 2054-7 (1979).
9. *Sternberg R., Apoteker A., Thévenot D. R.* Trace glucose electrode for clinical, food and environmental determinations. In *Analytical chemistry symposia Series*, vol. 2 (ed. W. F. Smith), pp. 461-473. Elsevier, Amsterdam, 1980.
10. *Sternberg R., Tallagrand T., Thévenot D. R.* Experimental and theoretical studies of enzymatic membranes used in enzyme electrodes. Communication to the Electroanalysis International Symposium, Cardiff (Great Britain), 1983, Abstract no. 82.
11. *Sternberg R., Tallagrand T., Thévenot D. R.* Enzymatic membranes used in enzyme-based electrodes. Communication to 1st National colloquium of the French Bioelectrochemistry Group, Port-Leucate (France), 1983, abstract n. 24, pp. 93-96.
12. *Tallagrand T., Grunberg M., Thévenot D. R.* Microcomputers for specific electrodes using immobilised enzyme. Communication to 1st National Colloquium of the French Bioelectrochemistry Group, Port-Leucate (France), 1983, abstract no. 25, pp. 97-101.
13. *Thévenot D. R.* Use of electrochemical methods in the characterization of enzymatic membranes. Communication to the 33rd Congress of the International Society of Electrochemistry, Lyon (France), 1982, p. 784.
14. *Thévenot D. R., Sternberg R., Coulet P. R.* A glucose electrode using high-stability glucose-oxidase collagen membranes. *Diabetes Care*, **3**, 203-6 (1982).
15. *Thévenot D. R., Coulet P. R., Sternberg R., Gautheron D. C.* A highly sensitive glucose electrode using glucose oxidase collagen film. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **5**, 548-53 (1978).
16. *Thévenot D. R., Sternberg R., Coulet P. R., Laurent J., Gautheron D. C.* Enzyme collagen membrane for electrochemical determination of glucose. *Anal. Chem.* **51**, 96-100 (1979).
17. *Thévenot D. R., Tallagrand T., Velho G., Reach G.* Enzyme electrodes for use *in vivo*. 30th I. U. P. A. C. Meeting, Manchester (UK), 1985.
18. *Tsuji N., Nakamura K., Endoh K., Hamada T., Ishida K.* Blood sugar analyzing apparatus. US Patent 4407959 A, 4 Oct 1983, 11 p. Appl. 313666, 21 Oct 1981; JP Appl. 80/150756, 29 Oct 1980; JP Appl. 80/172665, 9 Dec. 1980; JP Appl. 80/172666, 9 Dec 1980.
19. *Wieck H. J., Heider G. H., Yacynych A. M.* Simple approach to microcomputer-controlled electrochemistry. *Anal. Chim. Acta*, **166**, 315-9 (1984).

КОММЕРЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Глава 36

Биосенсоры в медицине: клинические требования

П. Д. Хоум, К. Дж. М. М. Альберти

Хотя современная медицинская практика все еще сильно зависит от традиционного опыта и знаний врача при наблюдении пациента, т.е. осмотре и анализе истории болезни, появление в этом столетии эффективной терапии удачно сочетается с быстрым развитием методов объективной оценки тяжести болезней (патологии) и хода лечения. Химические и биохимические измерения в медицине развились в отдельную дисциплину («клиническая патология», позже «клиническая биохимия») как ответвление традиционного лабораторного анализа, основанного на патологии тканей и микробиологии. Такая переориентация клинических лабораторий и особенно возрастание клинических требований приводят к все более широкому использованию сложных автоматических анализаторов. Необходимость проведения серийных биохимических анализов не позволяет клиническим лабораториям гибко реагировать на срочные запросы, вследствие чего лабораторное оборудование перемещается из небольших местных больниц в хорошо оборудованные специализированные центры.

В современной медицине имеются, однако, и противоположные тенденции [6]. Известно, что у тяжелобольных пациентов в отделениях интенсивной терапии могут происходить быстрые колебания биохимических показателей; в этом случае необходимо не только срочно выявлять изменения, но и не менее срочно реагировать на них. Быстрый рост числа операций на открытом сердце и особенно по пересадке почек означает, что многим людям требуется интенсивное жизнеобеспечение в течение коротких промежутков времени. Кроме того, теперь стало возможным более успешное лечение в случае внезапных приступов болезни, например острой почечной или печеночной недостаточности или сердечного приступа. Необходимость в быстрых биохимических измерениях нередко удовлетворяют с помощью небольших лабораторий, располагаемых прямо в палате. В таких лабораториях вначале использовали, как правило, традиционные аналитические методы; позже были созданы специальные приборы, рассчитанные на единичные измерения, дающие быстрые результаты. Здесь можно привести такие известные примеры, как устройства для определения газов крови, калия и глюкозы.

Вторая важная причина отхода от традиционной лаборатории вытекает из возрастающих темпов развития и напора современной медицины, что до некоторой степени обусловлено экономическими соображениями. И в больничных палатах, и в кабинетах врачей все меньше удовлетворены тем, что приходится анализировать состояние больного, проводить обследования и через некоторое время уточнять диагноз в свете результатов исследований. Пациенты, естественно, также не молчат о своем желании, чтобы их проблемы решались как можно скорее. В общем дело идет к тому, что некоторые исследования должны проводиться прямо в кабинете врача, поликлинике или больничной палате. Примеры приводятся ниже. В некоторых случаях необходимо иметь возможность быстрого обследования даже дома. Очевидным примером служит определение содержания глюкозы в крови при некоторых формах диабета.

Существенную роль сыграла также доступность полосок индикаторной глюкозо-оксидазной бумаги для определения глюкозы в капиллярной крови. Поскольку подкожное введение инсулина при диабете представляется весьма неудовлетворительным средством, знание уровня глюкозы в крови пациента как дома, так и в больничной палате очень полезно и для него, и для врача. Капиллярную кровь нетрудно отбирать из пальца. Широкое и вполне успешное применение данного метода [11] открыло клиницистам глаза на возможности «мгновенных» биохимических анализов и привело к осознанию потребности в еще более удобных и надежных в работе системах для определения глюкозы в крови.

Неустойчивость реакции организма на подкожное введение инсулина также дала толчок к созданию приборов, способных вводить инсулин внутривенно, что физиологически более целесообразно. Требуемое количество инсулина заметно варьирует в зависимости от приема пищи, физической нагрузки, стрессов, телесных повреждений, инфекций и даже времени суток. Поэтому значительное внимание привлекают приборы, которые могут непрерывно следить за содержанием глюкозы в крови и выходной сигнал которых можно использовать для управления инсулиновым насосом. Именно это достоинство такой «искусственной поджелудочной железы» [2] как магнитом почти неминуемо привлекает тех, кто больше интересуется применением биосенсоров в медицине, чем просто обычными измерительными приборами.

В этой главе предпринята попытка определить те области, в которых требования клиницистов могли бы быть удовлетворены использованием биосенсоров; затем обсуждается, что необходимо для внедрения таких приборов в медицинскую практику.

36.1. Возможности применения биосенсоров в медицине

36.1.1. Отделение интенсивной терапии

Довольно легко понять, что непрерывный или периодический (достаточно часто повторяемый) контроль состояния пациента в отделении интенсивной терапии может оказать большую помощь в лечении. Соответствующие возможности уже имеются в случае многих физических (пульс, кровяное давление, температура) и некоторых биохимических (кислород, рН, концентрация глюкозы) параметров. Можно также выделить другие биохимические параметры, контроль которых был бы полезен в отделении интенсивной терапии:

- В крови
 - кислород, CO_2 , рН
 - лактат
 - (аминокислоты, кетоны)
- В крови или подкожной ткани
 - глюкоза
 - натрий, калий
 - кальций
 - креатинин, мочевины
- В моче
 - натрий, калий
 - креатинин, мочевины

Труднее, однако, сказать, как внедрить такие системы в практику. Проблема состоит не только в клинических требованиях, но и в практической применимости приборов, которая зависит от простоты устройства и легкости использования. В настоящее время даже в тех отделениях, где имеются контролируемые содержанием глюкозы в крови системы для введения инсулина (искусственная поджелудочная

железа, Biostator), содержание глюкозы в крови на практике нередко определяют с помощью прикроватного измерительного прибора по цвету индикаторных полосок, а инсулиновый насос регулируют, исходя из опыта или используя известные алгоритмы.

Для определения в крови газов (кислород, диоксид углерода), рН и электролитов (натрий, калий) и впредь будут использовать преимущественно химические сенсоры. Поучительно, однако, рассмотреть различия в обработке получаемой информации. Парциальное давление кислорода в крови больных и ее насыщение кислородом в значительной степени определяются функционированием легких и кровообращением; их трудно корректировать простым изменением концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе или частоты дыхания. Кроме того, давление кислорода изменяется быстро. Поэтому здесь требуется действительно непрерывный мониторинг, но с обратной связью, замыкаемой человеком. Гораздо легче повлиять на входные и выходные характеристики баланса электролитов и воды. Если имеется возможность определять концентрации веществ в крови и моче, а также измерять расход жидкости, нетрудно представить себе автоматическое устройство, поддерживающее сбалансированный состав жидкости. Вход такого устройства должен контролироваться обратной связью, хотя здесь нужно учитывать опыт с устройством Biostator. Заметим, что в большинстве случаев достаточно проводить измерения ежечасно при условии, что есть дополнительное устройство для экстренной помощи.

Требования к определению глюкозы в крови сходны с требованиями в случае электролитов. Так, уже прикроватный прибор, управляемый вручную и обрабатывающий пробы крови с интервалами от 15 мин до 4 ч, является серьезным достижением по сравнению со стационарными лабораторными системами анализа крови. До некоторой степени этот рынок удовлетворяется измерительными устройствами на основе индикаторной бумаги, но время отклика таких приборов неприемлемо велико (2 мин) и, кроме того, требуется специальная подготовка оператора. Возможность непрерывного определения глюкозы в крови пациентов в отделениях интенсивной терапии имела бы ценность не только для диабетиков, но и для тех, кто принимает высокие дозы инотропных агентов (которые могут быть диабетогенными) для поддержания сердечной деятельности, а также при использовании растворов глюкозы высокой молярности для внутривенного вливания. Хотя в этих условиях желательно переходить к контролируемому содержанию глюкозы введению инсулина, на практике пациенты дополнительно принимают глюкозные растворы как для «буферирования» диабетического контроля, так и для снабжения организма несвязанной водой. Поэтому в отделениях интенсивной терапии довольно сложные системы контроля уровня глюкозы должны быть объединены с устройствами для поддержания водно-солевого баланса крови.

Важность определения других промежуточных метаболитов у пациентов, находящихся в критическом состоянии, еще только выясняется. Для таких исследований требуется разработка биосенсоров, позволяющих непрерывно определять в крови лактат, аланин и кетоны [7, 8]. За исключением случая молочнокислого ацидоза, сейчас трудно представить себе, как эта информация могла бы использоваться в клинике. На первых порах она просто позволит врачу глубже контролировать метаболическое состояние пациента. В отделениях интенсивной терапии могут быть исключительно полезны также мгновенные и периодические измерения, характеризующие почечную функцию (концентрация креатинина, мочевины).

36.1.2. Пункты срочной и неотложной помощи и общетерапевтические палаты

При виде больного в тяжелом состоянии с неопределенным диагнозом врач прежде всего нуждается в немедленных результатах биохимических анализов для дополнения

данных истории болезни и осмотра. На этой основе делаются заключения о мерах неотложной помощи. Для чего требуются результаты анализа – для диагностических целей или как руководство к терапии, – не столь существенно, за исключением того, что в последнем случае анализы могут повторяться в течение нескольких часов.

Перечень тестов, которые составляют 95% срочных обследований, невелик. Эти тесты перечислены ниже независимо от того, на какой основе (биосенсоры, физико-химические сенсоры, полоски индикаторной бумаги или стандартные биохимические методы) базируются соответствующие измерительные приборы.

Амилаза	Аммиак
Глюкоза	Натрий
Парацетамол	Калий
Салицилат	Кальций
Креатинкиназа	Креатинин или мочевины
Аспаратаминотрансфераза	O ₂ , pH, CO ₂

В большинстве случаев неотложной медицинской и хирургической помощи необходимо прежде всего иметь возможность быстрой оценки содержания в крови глюкозы и амилазы, а затем парацетамола и салицилата. Для подтверждения диагноза коронарного тромбоза проводят анализ на фермент креатинкиназу. Потребность в определении электролитов и креатинина (или мочевины), вообще говоря, высока, особенно в больницах, но особой срочности и важности в проведении таких анализов нет. Еще раз отметим, что электролиты и креатинин желательнее определять как в крови, так и в моче.

Хотя для оказания неотложной помощи в случае лекарственного отравления необходимо прежде всего провести анализ на парацетамол и салицилат, не так уж редки и случаи срочной госпитализации из-за передозировки других лекарств. Оценку содержания лекарственных веществ проводят не только для подтверждения диагноза, но и для того, чтобы принять меры по противодействию вредному влиянию лекарства (парацетамол) или ускорению его вывода из организма (салицилат). К сожалению, для большинства фармакологических средств такие меры невозможны, и поэтому при лекарственных отравлениях обычно проводят поддерживающее лечение (например, делают искусственное дыхание), что не требует идентификации лекарственных препаратов. Хотя здесь имеются исключения (фенобарбитал), а в некоторых случаях может быть полезной прогностическая информация (пакрават), локальная скорость отравления любым индивидуальным лекарственным веществом всегда будет невысока.

Если удастся успешно скомбинировать системы типа антиген – антитело с биосенсорами и определять на этой основе антиген вируса гепатита В или антиген вируса HTLV-III (СПИД), это во многом облегчит защиту лабораторного персонала. Аналогично по взаимодействию с антителами можно детектировать и некоторые лекарственные вещества – очевидным кандидатом здесь является сердечный препарат дигоксин, в случае которого часто необходим срочный результат анализа.

36.1.3. Кабинет врача

В этом случае также необходимо быстро получать информацию для более точного установления диагноза. Возможности проведения анализов непосредственно в кабинете врача будут варьировать от страны к стране, поскольку в отличие от Великобритании во многих странах кабинеты врачей находятся не в больницах. Иногда даже в кабинете врача требуется провести срочные диагностические тесты, чаще всего на глюкозу, амилазу и креатинкиназу. В диабетических клиниках определение глюкозы (при помощи индикаторных полосок) уже стало устоявшейся практикой как при диагности-

ке, так и при лечении пациентов. По мере все более широкого понимания роли липидов [4], по-видимому, возрастет потребность в определении в крови холестерина и триглицеридов, так как для избирательного скрининга населения и чтобы избежать излишних посещений врача пациентами результаты анализа необходимо иметь уже во время консультации. В клинике было бы полезно иметь под рукой также способы определения креатинина и калия.

Упомянутые выше тесты на вирусные антигены и лекарственные средства также были бы полезны в этой ситуации. Еще один пример из сегодняшней практики – определение уровня антиконвульсантов в неврологии.

36.1.4. Лечение сахарного диабета

Внимание конструкторов, специализирующихся в области сенсоров, сосредоточено на диабете по ряду причин. Диабет можно рассматривать как болезнь, связанную с относительным или абсолютным дефицитом информационно-эффекторного гормона инсулина – белка, вырабатываемого в поджелудочной железе элементарными природными биосенсорами, В-клетками островков Лангерганса [5]. Время жизни инсулина в крови очень мало (от 4 до 5 мин), и, следовательно, его концентрация (т. е. фактор, определяющий действие этого гормона) зависит от скорости секреции. В-клетки чувствительны к широкому кругу веществ (что вполне согласуется с многообразным биохимическим действием инсулина), причем наиболее важным из них является содержащаяся в крови глюкоза.

Концентрация глюкозы в крови жестко регулируется при помощи инсулина (в интервале от 3,5 до 5,5 ммоль/л). Недостаток инсулина при диабете приводит к высокому содержанию глюкозы, вызывающему при кратковременном воздействии на организм болезненное состояние, а при длительном – перерождение тканей.

Очевидный способ лечения диабета заключается в том, чтобы дать больному инсулин. Действительно, до того как инсулин стал доступен, пациенты, заболевшие диабетом, умирали через несколько месяцев после начала болезни. Без непрерывного наблюдения за содержанием глюкозы (и некоторых других веществ) невозможно поддерживать концентрацию инсулина в крови на нормальном физиологическом уровне. Так что у больных диабетом концентрация глюкозы в крови временами бывает слишком высокой, а при избыточном и неправильном введении инсулина – и слишком низкой.

Контроль больных диабетом и качество их жизни улучшилось с появлением глюкозооксидазных индикаторных полосок [11]. Для считывания их показаний сначала применяли довольно примитивные измерительные приборы, которые теперь, однако, существенно усовершенствованы. Следующим важным шагом вперед были предназначенные для визуальной оценки (по окраске) индикаторные полоски, что освободило пациентов от необходимости носить с собой или покупать измерительный прибор. Чтобы конкурировать с окрашиваемыми полосками, непосредственно показывающими результаты измерения, биосенсоры (проводящие анализ в капле крови) должны быть конкурентоспособными по стоимости (один анализ должен стоить, скажем, четыре фунта стерлингов), легкими, портативными и надежными. Розничная цена базового прибора не должна превышать 70 фунтов стерлингов; вполне вероятно, что такие устройства будут служить основой для более сложных регистрирующих приборов, способных давать рекомендации по дозировке инсулина.

Пациенты, однако, по-прежнему будут страдать от гипогликемических реакций, обуславливаемых случайным снижением концентрации глюкозы в крови по столь несходным причинам, как физическая нагрузка или прием алкоголя. Много усилий затрачивается на попытки разработки «детекторов гипогликемии» [3], но до сих пор

Таблица 36.1. Возможное использование биосенсоров при диабете

Тип сенсора	Характер применения	Где применяется
<i>Сенсоры глюкозы</i>		
Устройство для определения глюкозы в пятне крови	Серийные анализы	Дома (пациентом); диабетические клиники; кабинеты врачей; терапевтические и хирургические отделения
<i>Неотложная помощь</i>		
Игольчатые (подкожные)	Предупреждение о гипергликемии	Дома, в течение ночи
	Непрерывное измерение уровня глюкозы в крови	Наблюдение амбулаторных больных; подача инсулина обычным способом
	Непрерывный контроль	Подача инсулина гибридной системой с обратной связью
Внутривенные	Непрерывный контроль	Автоматическая система подачи инсулина
<i>Сенсоры кетонов</i>		
Устройство для определения кетонов в пятне крови	Диагностика кетоацидоза	Пункты скорой/неотложной помощи; диабетические отделения в больницах
Сенсоры для измерения через кожу или в выдыхаемом газе Подкожные	Предотвращение кетоацидоза	Дома или в больнице
	Дополнение к системе подачи инсулина	Амбулаторные больные
Комбинированный глюкоза/кетонный	Непрерывный контроль	Автоматическая система подачи инсулина
<i>Сенсор лактата</i>		
Внутривенный	Тяжелобольные пациенты	Отделение интенсивной терапии
Комбинированный глюкоза/лактатный	Непрерывный контроль	Автоматическая система подачи инсулина
<i>Сенсоры аминокислот</i>		
Комбинированный глюкоза/аминокислотный	Непрерывный контроль	Автоматическая система подачи инсулина

все они основываются на изменениях проводимости кожи (вследствие выделения пота). Эти изменения, однако, очень неспецифичны, и после нескольких случаев ложной тревоги пациент (или его родители) откажутся от использования таких детекторов. Очевидный способ обойти это затруднение состоит в том, чтобы определять фактическое содержание глюкозы в крови или связанную с ним величину концентрации глюкозы в подкожной ткани. Такой способ применения постоянно носимых игольчатых сенсоров глюкозы даже более важен, чем управление инсулиновым насосом, поскольку большинство приступов гипогликемии происходит ночью и сенсор приходится подключать только на время сна. Помимо подстраховки пациента дома, регистрация изменения концентрации глюкозы в течение нескольких ночей может оказать значительную помощь в выборе режима инсулиновой терапии.

Предварительные технические условия использования сенсоров в медицине детально обсуждаются ниже. Очевидно, однако, что для управления инсулиновым насосом можно использовать только сигнал сенсора, быстро реагирующего на изменение концентрации глюкозы в крови и характеризующегося надежностью, селективностью и отсутствием дрейфа базовой линии. Объединение такого сенсора с неизбежно довольно сложным имплантируемым инсулиновым насосом (который должен был быть опробован в 1986 г.) позволит создать эффективную искусственную поджелудочную железу. Подкожные сенсоры [9] обладают очевидными преимуществами в смысле доступности, однако во время приема пищи их сигналы запаздывают по сравнению с изменениями концентрации глюкозы в крови. Найти решение этой проблемы довольно трудно, поскольку физиологическая концентрация инсулина после еды увеличивается очень быстро [1]. Кроме того, для управления имплантированным насосом сигнал должен как-то передаваться через кожу к насосу. Поэтому первые подкожные сенсоры, видимо, лучше использовать совместно с обычными способами введения инсулина под кожу (инъекцией или с помощью дозирующего насоса), обрабатывая данные в уме или при помощи специализированного компьютера [10].

Было бы полезно определять у пациентов, страдающих диабетом, и другие субстраты (табл. 36.1). При физиологически наиболее целесообразном ежедневном введении инсулина возрастает риск острых обострений диабета при других болезнях (например, инфекции), и желательным было бы иметь прибор, предупреждающий о высоком уровне содержания кетонов (например, 3-гидроксисобутирата) в крови. Для этой цели снова наиболее пригодны накожные и подкожные сенсоры (или детекторы ацетона в выдыхаемом воздухе). Быстрое увеличение концентрации лактата в крови может наблюдаться не только в отделениях интенсивной терапии. В отсутствие физической нагрузки это свидетельствует о сверхбыстром увеличении скорости оборота глюкозы, связанном с передозировкой инсулина. Объединение лактатного сенсора и сенсора глюкозы, контролирующего подачу инсулина, могло бы быть первым шагом к достижению совершенства, свойственного природным В-клеткам. Следующими кандидатами на постоянный контроль в системе искусственной поджелудочной железы являются аминокислоты.

36.2. Применение биосенсоров в медицине

Применение техники в медицине налагает специальные требования, которые неизбежно меняются в зависимости от того, соседствует ли прибор с тканями человека, насколько его выходной сигнал, несущий информацию или воздействующий на организм, важен для обеспечения жизненных функций. Во многих ситуациях детектирующие и измерительные приборы, хотя и могут предупреждать об отклонениях от нормы, но не обеспечивают модификации лечения без вмешательства человека. Так, например, отклонения частоты сердечных сокращений сами по себе, без врача, не вызывают импульсы постоянного тока, стимулирующие работу сердца (кардиоверсия). В более сложных случаях это связующее звено может быть утеряно, и его невозможно восстановить. Наиболее известный пример — водители ритма сердца, выходной сигнал которых может спасти жизнь, но может быть и фатальным.

Эти различия приводят к тому, что выдвигаются самые разные требования к надежности, точности, биосовместимости, безвредности для пациента и взаимодействию с ним. С инженерной точки зрения прибор для внешних измерений, проходящий обычный контроль качества, может быть сконструирован немногим надежнее, чем требуют обычные потребительские стандарты; постоянно используемые дома приборы, от которых зависит жизнь пациента, должны удовлетворять техническим условиям уровня военной и аэрокосмической промышленности.

36.2.1. Правильность, воспроизводимость и чувствительность

Совершенно очевидно, что любой измерительный прибор должен давать результат, близкий к реальному значению измеряемой величины (правильность) и с достаточной воспроизводимостью, чтобы можно было доверять его показаниям. Обычно правильность не является проблемой для приборов, градуируемых по известным эталонным методам, если только отсутствует дрейф градуировки. Клиническая медицина удивительно нетребовательна к воспроизводимости в отличие от, например, химической технологии. По крайней мере врачи, принимая решение на месте, обычно не реагируют на различия в $\pm 10\%$, хотя при последовательных измерениях такая разница вполне может быть значимой и отражать тенденцию, обуславливаемую лечением. В некоторых обстоятельствах (определение мочевой кислоты в сыворотке или, например, высоких концентраций амилазы или парацетамола в крови) достаточно даже меньшей воспроизводимости.

Необходимо, однако, с осторожностью интерпретировать клинические требования в свете современной медицинской практики. Сейчас многие пациенты сами определяют содержание глюкозы в крови по индикаторным полоскам с точностью $\pm 30\%$ (что соответствует шагу эталонной шкалы цветности) и представляют данные своим врачам, которым вполне достаточно этих данных для уточнения дозировки инсулина. Такая неточность, однако, неприемлема, если каждое измерение используется для регулировки дозы инсулина, поддерживающей постоянную физиологическую концентрацию глюкозы в крови. Это возможно в случае, когда терапевтически более эффективно подкожное введение инсулина. Можно предполагать, что если данные по содержанию глюкозы используются для решения более сложных задач (расчет дозы, установление связи между поглощением пищи и инсулиновой чувствительностью, введение обратной связи в управление внутривенной подачей инсулина), то требуется большая воспроизводимость.

Важно понимать, что рабочий диапазон измерительного прибора, предназначенного для использования в клинической медицине, определяется в общем случае патофизиологическим, а не физиологическим диапазоном изменений измеряемой величины. Как уже отмечалось, в норме концентрация глюкозы поддерживается между 3,5 и 5,5 ммоль/л, но важно и чтобы прибор мог различать 1 ммоль/л и 2 ммоль/л. При этом следует иметь в виду, что зарегистрированное изменение от 50 до 40 ммоль/л вполне реально. При низкой активности щитовидной железы большое значение имеет контроль за содержанием гормона тиреотропина, которое при данных обстоятельствах возрастает. Эндокринологи же долгое время использовали метод анализа, который не позволяет различать концентрации тиреотропина ниже верхнего предела его физиологического диапазона. Следовательно, чувствительность прибора необходимо специально «подгонять» к его назначению в медицине.

Создание все более портативных, точных и надежных измерительных приборов неизбежно будет дальнейшим стимулом к увеличению спроса на эти приборы в исследовательской медицине. От разработчиков биосенсоров можно ожидать новых приборов, обладающих высокой правильностью и воспроизводимостью, пригодных для клинической практики и фундаментальных физиологических исследований.

36.2.2. Время отклика

Результаты анализа проб крови, посланных в обычную больничную лабораторию, получают обычно в пределах от 30 мин до нескольких дней. В течение этого времени врач продолжает лечение, исходя из клинического диагноза. Парадоксально, но при проведении анализа у постели больного время отклика прибора приобретает большее

значение, поскольку здесь обычно приходится принимать немедленное решение. Как уже отмечалось, именно в этом отношении биосенсоры должны влиять на организацию работы в клинике. Дело в том, что в ожидании получения результатов анализа от прибора сенсорного типа персоналу не хватает времени, чтобы заняться какой-либо другой деятельностью. Поэтому общее время измерения (включая градуировочные и подготовительные процедуры) не должно превышать 120 с. Желательно, чтобы время отклика сенсора составляло 30 с. Важно также, чтобы до истечения этого времени не было возможности считывать промежуточные результаты.

36.2.3. Градуировка

В настоящее время трудно представить себе биосенсоры, которые могли бы сохранять необходимую точность при периодическом или непрерывном использовании в течение длительного времени. Конечно, такой проблемы не возникает в случае одноразовых устройств. Более того, если физические приборы, например рефлектометры, можно градуировать, используя подготовленные заранее сухие индикаторные полоски или фильтры, биосенсоры нуждаются в градуировке по растворам, содержащим определяемое вещество. При необходимости в растворы приходится вводить фиксированные количества мешающих веществ. Даже при малых временах отклика проводить градуировку сенсора при каждом его использовании было бы неудобно. Очень желательно, чтобы приборы заранее программировались на градуировку после фиксированного числа анализов и через фиксированные интервалы времени. Сенсор, используемый для серийных анализов, непрактично подвергать внешней градуировке с использованием лабораторного оборудования. Следует, однако, предусмотреть возможность контроля качества работы прибора клиническим или лабораторным персоналом.

При измерениях *in vivo* возникают новые проблемы. В частности, срок службы сенсора нередко ограничивается падением точности показаний. Вообще предполагается, что любая вводимая внутривенно или подкожно игла должна работать как минимум 24 часа (подкожные проводники или канюли обычно необходимо заменять максимум через 3 дня). В больничных условиях обычно предпочитают внешнюю градуировку по пробе крови. Однако необходима осторожность, если концентрации определяемых веществ в крови связывают с концентрациями в тканях больных. Глядя в будущее, можно предположить, что внешнюю градуировку имплантированного на длительный срок сенсора будут проводить с помощью капли капиллярной крови (вероятно, через специальное внешнее устройство). Однако такую градуировку нельзя проводить чаще одного раза в сутки (самим пациентом).

36.2.4. Мешающие вещества

Проблема неспецифичности биосенсоров в связи с анализом биологических жидкостей общеизвестна. Биоинженерам важно понять, что концентрационный диапазон любого мешающего вещества в крови не совпадает с его физиологическим диапазоном. В крови тяжелобольных людей могут содержаться очень далекие от нормы количества глюкозы, кислорода, органических кислот, солей мочевой кислоты и т. д., а именно для таких пациентов прежде всего предназначен мониторинг *in vivo*. Кроме того, в медицине стало почти правилом применять множество лекарственных средств. Лекарственные препараты (и их метаболиты) являются еще одним потенциальным источником помех.

36.2.5. *Анализируемые пробы*

Клиницисты используют для анализа любые жидкие пробы, которые они могут получить из организма пациента, — мочу, спинномозговую жидкость, слюну, пот, выпоты и эксудаты, — но чаще всего кровь. Кровь — это биологическая жидкость, которую легче всего получить, особенно в экстренных ситуациях, и состав которой отражает химические изменения, происходящие в теле. К сожалению, при работе с кровью возникают две частные проблемы. Во-первых, переменная доля объема крови приходится на эритроциты (которые сами примерно на 30% состоят из белка гемоглобина), внутренний состав которых отличается от состава плазмы. Во-вторых, кровь содержит ряд веществ, отобранных в ходе эволюции специально для взаимодействия с поверхностями. Эритроциты можно отделить от плазмы центрифугированием, но это требует времени и специального оборудования, а также может быть затруднен при малых объемах проб. Кроме того, механическое разрушение центрифужных пробирок может представлять реальную опасность для здоровья вследствие образования аэрозолей плазмы.

Таким образом, сенсоры следует включать в системы, в которые поступает кровь; это позволяет оценивать содержание в плазме веществ, для которых не устанавливается быстрое равновесие через мембраны эритроцитов.

36.2.6. *Безопасность и надежность*

Казалось бы, можно сказать, что прибор пригоден для медицины, если шансы спасения жизни с его помощью выше его опасности для жизни. Однако на практике эта простая идея неприемлема, даже если риск поддается количественной оценке, что обычно сделать трудно. Кроме того, в медицине лечение часто направлено на облегчение болезни (страданий), а не устранение угрозы смерти. Введение опасности для здоровья (и жизни) вместо такого лечения или в качестве средства лечения чревато этическими и социальными осложнениями. Вообще, чтобы любой новый способ лечения или прибор стал приемлемым для медицины, выгоды от его использования должны намного перевешивать возможные проблемы.

36.2.6.1. Ошибочные результаты. Необходимо всегда иметь в виду возможность отказа любого сенсора. Отказ может приводить к ошибочному результату, а затем — к неверному автоматическому срабатыванию или информационному отклику сенсорной системы. Примером опасного отклика может быть чрезмерное усиление сигнала глюкозного *in vivo* сенсора, управляющего системой подачи инсулина. Использование дома прибора для определения глюкозы в крови, дающего такую же ошибку, может привести к тому, что пациент предпримет опасные действия, корректируя обнаруженное «отклонение» от нормы. Точно так же, если из-за отказа прибора не обнаружено реальное отклонение от нормы, может случиться, что врач не примет соответствующих мер в опасных для жизни обстоятельствах. Подходящими примерами здесь могут быть также случаи высокого содержания кетонов в крови (диабетический кетоацидоз) или отравления парацетамолом.

Сложные приборы для мониторинга *in vivo* могут включать схемы для обнаружения отказов электроники, хотя не может быть гарантий против ошибочного сигнала сенсора, если только не используются дублирующие сенсоры. В некоторых пределах сенсорные устройства можно программировать на определение скорости изменения измеряемого параметра с выдачей сигнала тревоги, если эти изменения выходят за допустимые границы. Следует, однако, учитывать, что ошибка измерения обычно растет быстрее, чем ожидаемые вследствие болезни изменения. Таким образом, при проектировании всех частей сенсорных приборов необходимо постоянно обращать

внимание на надежность, ориентируясь при этом на самые высокие технические стандарты.

Вынести суждение о приборах, предназначенных для работы у постели больного или управляемых им самим, значительно труднее. Частично это связано с тем, что для массового использования таких приборов они должны продаваться по разумной цене. Частично ответ находится в руках самих врачей, которые должны убедить пациентов не реагировать на одиночный результат, который может привести к опасному изменению намеченного лечения, без обдумывания и, возможно, дополнительной проверки.

36.2.6.2. Токсичность. Совершенно очевидно, что приборы для мониторинга *in vivo* должны быть сделаны из нетоксичных материалов. Значительный коммерческий опыт накоплен в отношении композиционных материалов (металлов и пластиков), используемых в сердечных клапанах, водителях ритма сердца, протезах костей и кровеносных сосудов. Следует также обратить внимание на новые органические вещества, в том числе ферменты, которые могут выселячиваться из сенсоров или так или иначе захватываться клетками — «сборщиками мусора» (макрофагами). Вполне вероятно, что при использовании биосенсоров может возникнуть и проблема активации иммунной системы — появления антител, приводящих к повреждению органов вследствие нарушения иммунной системы или амилоидоза. Эти проблемы можно частично решить, используя лишь допустимые для организма количества токсичных или антигенных веществ и удерживая большинство из них за диффузионными барьерами.

36.2.6.3. Механические повреждения. Каждый разрез или прокол кожи есть нарушение анатомической целостности, а любое продвижение в глубь тела сопряжено с еще большим риском нарушения жизненных функций. Сенсоры, помещенные в подкожную ткань и связанные с проходящими через кожу проводами, являются «входными воротами» для инфекции. Поэтому они должны быть стерильными и заменяться каждые 1–3 дня. Риск инфекции еще выше для приборов, помещенных в кровеносную систему. Однако из-за сложности процедуры введения таких приборов в вену их регулярная замена возможна практически только в отделении интенсивной терапии или операционной. Следовательно, такие приборы следует имплантировать целиком и рассчитывать на большой срок службы (более двух лет). Кроме того, не до конца выяснена опасность тромбоза. Из опыта применения проводников водителей ритма сердца вытекает, что в кровеносный сосуд нельзя вводить что-либо выступающее за его стенки. Это может серьезно ограничить возможности сенсора!

При внутримышечном использовании сенсорных приборов имеется риск их механического разрушения вследствие длительного пребывания в постоянно движущейся среде при 37 °С.

По всем этим причинам сенсоры, предназначенные для постоянного нахождения в мышечной ткани человека, должны испытываться в течение ряда лет на собаках и свиньях; лишь тогда они могут быть одобрены контролирующими органами.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ahmed M., Gannon M. C., Nuttall F. Q.* Postprandial plasma glucose, insulin, glucagon and triglyceride responses to a standard diet in normal subjects. *Diabetologia*, **12**, 61–7 (1976).
2. *Fogt E. J., Dodd L. M., Jenning E. M., Clemens A. H.* Development and evaluation of a glucose analyser for a glucose-controlled insulin infusion system (Biostat). *Clin. Chem.*, **24**, 1366–72 (1978).
3. *Levandowski L. A., White N. H., Popp D., Santiago J. V.* Teledyne sleep sentry — a possible aid for the detection of symptomatic nocturnal hypoglycaemia in insulin-dependent diabetes. In *Artificial systems for insulin delivery* (eds P. Brunetti, K. G. M. M. Alberti, K. D. Hepp, A. M. Albisser, M. Massi-Benedetti), pp. 353–6. Raven Press, New York, 1983.
4. Lipid Research Clinics Program. The lipid research clinics coronary prevention trial results. *J. Am. Med. Assoc.*, **251**, 351–64 (1984).

5. *Malaisse W. J., Sener A., Herchuelz A., Hutton J. C.* Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism*, **28**, 373–86 (1979).
6. *Clinical biochemistry nearer the patient.* Marks V., Alberti K. G. M. M. (eds.). Churchill Livingstone, Edinburgh, 1985.
7. *Noy G. A., Alberti K. G. M. M.* *In vivo* monitoring of intermediary metabolites. In *Advances in clinical biochemistry* (eds. K. G. M. M. Alberti, C. P. Price), vol. 2, pp. 229–41. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1981.
8. *Noy G. A.* *In vivo* monitoring of metabolites using enzyme based analytical techniques. In *Applied biochemistry and bioengineering* (eds. L. B. Wingard, Jr., E. Katzin-Kataliski, L. Goldstein), vol. 3, pp. 233–52. Academic Press, New York, 1981.
9. *Schichiri M., Kawamori R., Yamasaki Y., Hakui N., Abe H.* Wearable artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor. *Lancet*, **ii**, 1129–31 (1982).
10. *Schiffrin A., Mihic M., Leibel B. S., Albisser A. M.* Computer assisted insulin dosage adjustment. *Diabetes Care*, **8**, 545–52 (1985).
11. *Tattersall R. B.* Home blood glucose monitoring. *Diabetologia*, **16**, 71–4 (1979).

Проблемы распространения и сбыта биосенсоров

Джеймс Маккан

В последние годы биосенсоры привлекают значительное внимание как достойные преемники целого ряда аналитических методов контроля, использовавшихся в клинических лабораториях, ветеринарии и пищевой промышленности. Действительно, потенциальные приложения сенсорной техники столь широки, что в короткой главе можно лишь отметить некоторые наиболее важные тенденции, проявившиеся при распространении и сбыте этих приборов за последние несколько лет. Кроме того, может возникнуть проблема точного определения самого понятия «биосенсор».

Возьмем, к примеру, рынок клинической биохимии, где уже по меньшей мере лет десять имеется множество анализаторов. К биохимическим анализаторам относят как небольшие ручные модели стоимостью несколько сотен фунтов, так и громоздкие автоматические системы, стоящие многие тысячи. Ко многим из этих анализаторов термин биосенсор вполне применим, хотя так их называют редко.

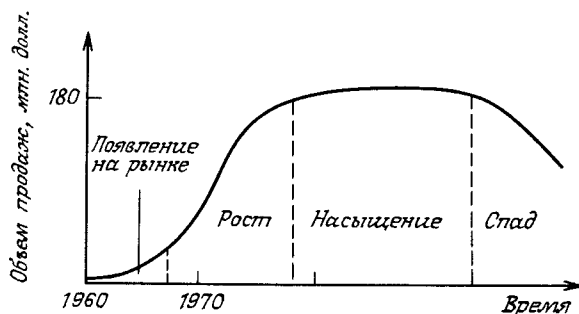
Затронув проблему определения и упомянув о широком диапазоне продукции, явно попадающей в категорию биосенсоров, автор решил принять не слишком строгое определение термина «биосенсор». Поэтому он не извиняется за включение в рассмотрение приборов, которые обычно так не именуют. Они включены сюда не только как фоновый материал, но и в качестве примеров, показывающих, что может или не может случиться с некоторыми из новых приборов, обсуждаемых в разных местах этой книги. Кроме того, эти относительно старые аналитические приборы могут помочь выявить факторы, способствующие коммерческому успеху (или наоборот, неуспеху) биосенсоров, т.е. ту «невидимую руку» рынка, что была столь мила сердцу экономистов восемнадцатого столетия.

Чтобы обсуждать по определенному плану вопрос, как и где рекламировать биосенсоры, обратимся к хорошо известной старейшинам Мэдисон-авеню концепции жизненного цикла товара. Эта концепция широко применяется с 70-х гг. для объяснения поведения рынка и лежащих в его основе причин. Ее важность вытекает из того факта, что на различных стадиях цикла жизни товара рынок ведет себя определенным образом независимо от природы самого товара. Так, каждая стадия цикла характеризуется определенной степенью конкуренции, объемом рынка, рекламой и методами распространения продукции. В данном обсуждении интересующим нас продуктом являются биосенсоры. Давайте проанализируем следующие рынки сбыта этих приборов — здравоохранение, ветеринария, контроль ферментации и других технологических процессов. Эти три рынка выбраны потому, что они соответствуют различным стадиям цикла жизни товара и потому представляют для биосенсоров совершенно разные возможности. Вместе они составляют основные рынки сбыта биосенсоров. Но сначала вкратце рассмотрим обобщенный цикл жизни товара.

37.1. Цикл жизни товара

Цикл жизни товара обычно делят на четыре отдельные стадии: появление на рынке, рост сбыта, завершение развития, спад. Фаза появления товара на рынке характе-

Рис. 37.1. Цикл жизни товара: рынок радиоиммуноаналитических методик в США.



ризуется начальным объемом продаж (в денежном выражении) после создания товара и его выхода на рынок. По мере увеличения объема продаж рынок переходит в фазу роста, характеризуемую увеличением объема продаж. Когда этот рост замедляется, рынок достигает периода спада. Этот жизненный цикл схематически показан на рис. 37.1.

Фаза появления (введения товара на рынок) обычно является результатом многолетних исследований и разработок, проводимых какой-либо фирмой. В случае биосенсорных приборов их разработка является завершением лабораторных исследований, модельных испытаний, поддержки должностных лиц и масштабных клинических испытаний.

И если уж продукт создан, фирма должна затратить значительные средства на создание системы его распространения, маркетинг и сервисную сеть, а также профессиональную подготовку потребителей. Успех товара очень сильно зависит от эффективности этой программы. Таким образом, относительно неудачные товары могут продаваться вполне успешно благодаря удачному маркетингу, тогда как куда более качественные могут идти с трудом. Здесь можно провести аналогию с компьютерами: фирма IBM, превосходно организующая маркетинг, сервис и сбыт, доминирует на рынке, несмотря на то, что не лучшую архитектуру ее компьютеров.

В случае медицинских товаров фаза введения обычно довольно продолжительна. Тому есть ряд причин: высокая сложность, большое число людей, ответственных за апробацию нового метода (врачи, младший медицинский персонал, администраторы); риск, связанный с переходом к новому методу вместо устоявшегося; расходы на закупку нового оборудования; врожденный консерватизм некоторой части медиков. Расходы на преодоление этих препятствий и признание рыночной ценности медицинского товара обычно во много раз выше затрат на исследования и разработку. Поэтому многие небольшие инновационные фирмы, знающие толк в изобретениях и разработках, не получают ожидаемого дохода от инвестиций из-за отсутствия ресурсов для решения этих проблем. В течение фазы введения товара пионерская фирма, как правило, занимает монопольное положение, которое подкрепляется патентами, полученными в период исследований.

Фаза роста обычно характеризуется быстрым ростом объема продаж. Однако увеличение сбыта и высокие цены, взимаемые монопольным поставщиком, привлекают конкурентов и стимулируют появление новых товаров. По своим характеристикам эти новые товары, как правило, максимально близки к существующим, но не настолько, чтобы нарушался патент. Во многих случаях новыми конкурентами являются специализирующиеся в области здравоохранения большие фирмы, которые рассчитывают расширить первоначальный спрос на данный товар за счет больших расходов на рекламу и маркетинг, а также его распространения по всему миру. В результате объем продаж возрастает еще больше. Такие фирмы имеют большие штаты юристов

и разработчиков, что позволяет им обойти пионерскую фирму. В фокусе их внимания обычно совершенствование, а не изобретение продукта, поэтому маловероятно, чтобы они были способны на пионерское введение продукта.

Ускоренное увеличение объема продаж в фазе роста обуславливается возрастающим признанием товара потребителем, подтверждением надежности продукта, большими расходами на маркетинг и рекламу, повсеместной доступностью товара. Однако по мере насыщения рынка рост объема продаж замедляется и рынок переходит в период насыщения.

Эта стадия характеризуется большим числом конкурентов, которые продают товары, изготовленные по очень сходной технологии. Новизна, охраняемая патентной защитой, размывается временем, взаимными лицензионными соглашениями и бесчисленными попытками обхода патента. Поскольку теперь перед покупателем имеется масса товаров, функционирующих примерно одинаково, возникает интенсивная конкуренция цен, приводящая к их снижению. При этом некоторые конкурирующие фирмы могут совсем оставить рынок или будут пытаться выделить свой продукт посредством «дифференциации» — изменяя некоторые характеристики товара, за что покупатель будет готов платить дороже. Как можно представить, на этой стадии выйти на рынок действительно трудно, если только у вас нет чего-либо из ряда вон выходящего. Ведь потребители, вложившие большие средства в существующее капитальное оборудование и подготовку персонала, не хотят никаких изменений.

Окончательно рынок начинает приходить в упадок из-за устаревания товара, появления радикально новой техники или заменяющего товара.

По-видимому, лучшим примером развития рынка, имеющего отношение к биосенсорам, является рынок радиоиммуноаналитических методов. Этот рынок начал развиваться в начале 60-х гг. после того, как выяснилось, что радионуклидную метку можно использовать для количественного контроля взаимодействия специфического антитела с соответствующим антигеном. Со времени создания этот метод был единственным средством выполнения многих стандартных анализов в данной области. В результате в течение 60–70-х гг. рынок быстро рос и привлек много фирм. Техническое совершенствование радиоиммунных методов, вначале быстрое, затем замедлилось, и в середине 70-х гг. большинство конкурентов продавало сходную продукцию. Поскольку для подсчета числа радиоактивных меток можно использовать любой имеющийся гамма-счетчик, многие клинические лаборатории покупали только один счетчик и стало обычным делом менять поставщиков. Выбор покупателя теперь обуславливался главным образом ценой. Соответственно и прибыли многих поставщиков упали. Рынок стал обнаруживать все признаки фазы полного развития.

Сейчас, однако, рассматриваемый рынок входит в период медленного упадка вследствие появления аналитических методов, главным образом связанных с использованием ферментных и флуоресцирующих меток для антител. Достоинствами этих новых методов являются удобство в обращении, простота хранения и транспортировки веществ, более низкая стоимость оборудования. Тем не менее отказ от радиоиммуноаналитических методов будет происходить медленно из-за больших капиталовложений в гамма-счетчики и подготовку персонала. Действительно, методики радиоиммуноанализа все еще составляют не меньше 40% рынка иммуноаналитических методов в США, несмотря на то что ферментные метки были созданы почти десять лет назад.

В табл. 37.1 приведены оценки объемов рынка различных иммуноаналитических реагентов в США по состоянию на 1984 г. На первом месте здесь радиоиммуноанализ с годовым объемом продаж до 250 млн. долларов. В табл. 37.2 выделено десять радиоиммуноаналитических тестов с наибольшим объемом продаж.

Следующей наиболее крупной разновидностью иммуноанализа в табл. 37.1 явля-

Таблица 37.1. Оценка объема продаж для отдельных категорий товаров на рынке иммуноаналитических реагентов (США, 1984 г.)

Область применения реагентов	Примерный объем продаж, млн. долл.
Иммунология	40
Консервирование крови	80
Серология	80
Радиоиммуноанализ	250
Неизотопные (главным образом ферментные) методы анализа	160
Всего	610

Таблица 37.2. Распределение рынка для десяти наиболее популярных радиоиммуноаналитических тестов (США, 1983 г.)*

Тест	Примерный объем продаж, млн. долл.
Гепатит	50
T ₄	30
Дигоксин	20
Хорионический гонадотропин человека	20
B ₁₂ /фолат	12
Гормон, стимулирующий щитовидную железу	11
Эмбриональный канцерогенный антиген	10
Кортизол	8
T ₃	7
Ферритин	6
	174

* В 1983 г. общий объем продаж радиоиммуноаналитических тестов в США оценивается в 260 млн. долл.

Таблица 37.3. Распределение рынка иммуноферментных методов анализа (США, 1984 г.)*

Тест	Примерный объем продаж, млн. долл.
Теофиллин	30
Фенитоин	11
Дигоксин	6
Фенобарбитал	8
Тобрамицин	9
Гентамицин	8
	72

* В 1983 г. общий объем рынка иммуноферментных методов анализа в США оценивался в 120 млн. долл. и делился приблизительно между сорока тестами. По оценке объем продаж на этом рынке растет ежегодно на 10%.

ется неизотопный анализ, главным образом с использованием фермента вместо радиоактивной метки. В этой области иммуноаналитического рынка идет наиболее быстрый рост, так как пользователю предлагается комбинация легкости в обращении, низкой стоимости оборудования, простоты методик и возможности быстрого получения результатов анализа. В табл. 37.3 выделены шесть наиболее популярных тестов на рынке ферментного иммуноанализа.

Остаток рынка иммуноаналитических методов включает реагенты, используемые в иммунологии, консервировании донорской крови и серологии. Первая группа охватывает реагенты для определения иммунопротеинов; вторая – наборы для скрининга крови перед переливанием, включая определение группы крови, и, наконец, третья – реагенты, используемые для определения бактериальных и вирусных антигенов, а также диагностики различных метаболических болезней, таких как волчанка и артрит.

Рассмотрев вкратце поведение рынка вообще и современное состояние рынка иммуноаналитических методов в США, перейдем теперь к анализу рынка биосенсоров в выделенных нами областях.

37.2. Здравоохранение

В области здравоохранения аналитическая химия традиционно привязана к центральной клинической лаборатории. Такие лаборатории располагаются в больших больницах и предназначены для анализа проб, взятых у пациентов всей больницы или даже всего округа. Такая структура обусловлена сложностью задач, которые должны выполняться в клинических лабораториях относительно небольшим высококвалифицированным штатом. Со временем постоянно возрастающий объем анализов привел к появлению специальных устройств для автоматической обработки и разбавления проб. Производители такого оборудования ориентируются на выпуск больших анализаторов для клинических лабораторий, способных обрабатывать за один день сотни проб. Высокая стоимость таких приборов способствовала дальнейшей централизации клинических лабораторий. Действительно, основной причиной сосредоточения анализов в одной централизованной лаборатории является именно высокая стоимость анализаторов.

В настоящее время рынок оборудования и реагентов для клинических лабораторий обнаруживает все признаки насыщения. В 1971 г. на этом рынке было примерно пять конкурирующих фирм, объем продаж составлял около 600 млн. фунтов стерлингов и возрастал ежегодно на 15%. К 1983 г. объем продаж вырос приблизительно до 1,4 млрд. фунтов, но число конкурентов достигло 17, а рост по оценке составлял от 0 до 4%. Некоторые конкуренты, например фирма Eastman Kodak, фактически понесли заметные потери. При этом большинство анализов проводилось по одной и той же методике: обычно она базировалась на УФ-спектрометрии в комбинации со сложными автоматическими пробоотборниками. Таким образом, патентная защита здесь, видимо, не имела большого значения. Еще важнее то, что для потребителя новые анализаторы фактически неразличимы: стоит только нажать несколько кнопок и через несколько секунд компьютер выдает распечатку результатов анализа. В такой ситуации потребитель руководствуется исключительно ценой, и поэтому рынок становится очень чувствителен к ценам.

На рассматриваемом рынке потенциальные возможности новых биосенсоров весьма ограничены. Существующие анализаторы характеризуются быстротой, простотой в использовании и точностью. Конкуренция в этой области является вполне устойчивой и в значительной степени контролируется медиками. Более того, даже если новая биосенсорная техника позволит снизить реальную стоимость реагентов и сенсорного элемента, уменьшение цены реализации всего анализатора будет минимальным,

поскольку большая часть стоимости всего прибора приходится на системы пробо-оборота и обработки данных.

Наиболее перспективные новые рынки биосенсоров не связаны с центральной клинической лабораторией. Эти новые рынки развиваются прежде всего вследствие законодательных попыток снизить расходы на здравоохранение. Впереди всех в этой области идут США, которые в 1983 г. тратили на здравоохранение 10% своего валового национального продукта, что вдвое больше уровня аналогичных расходов Великобритании.

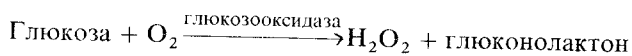
В 1984 г. в США были введены новые правила покрытия расходов больниц с тем, чтобы побудить их снизить стоимость лечения пациентов. На деле это привело к тому, что длительность пребывания пациентов в больницах уменьшилась, а терапевтическое лечение проводится в поликлиниках, приютах и домах пациентов, где стоимость лечения значительно ниже. Во многих случаях эти изменения потребовали разработки новых дешевых методов диагностики, контроля состояния пациента и терапии. Короче, эти изменения ставят вопрос о биосенсорах, которые можно эксплуатировать неквалифицированным персоналом вне клинической лаборатории.

Требования к этим приборам весьма отличаются от требований, предъявляемых к большим клиническим анализаторам. Медики купили бы большое число биосенсоров, чтобы иметь их в каждой больничной палате, поликлинике или приемной врача. Поэтому они должны быть дешевыми. Кроме того, поскольку биосенсоры будут обслуживаться неквалифицированным персоналом, они должны быть просты в обращении и требовать минимальной предварительной обработки пробы. В то же время они должны сохранять приемлемую точность. Для иллюстрации данного вопроса сравним устройства для определения глюкозы, применяемые в клинической лаборатории и вне ее. В табл. 37.4 приведены характеристики двух таких приборов. С одной

Таблица 37.4. Сравнение клинического и портативного анализаторов глюкозы

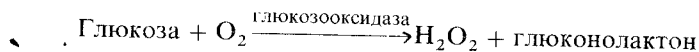
Прибор	Стоимость, долл.	Вес, кг	Требуемая проба
Портативный анализатор (глюкометр)	150	1	50 мкл цельной крови
Клинический биохимический анализатор фирмы Yellow Springs Instruments	6000	30	20 мкл плазмы

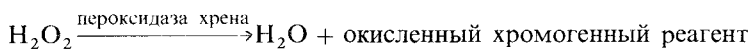
стороны, здесь представлен клинический анализатор фирмы Yellow Springs Instrument — амперометрическая система для определения глюкозы на основе ферментативного окисления последней по реакции



с последующим электрохимическим окислением H_2O_2 на платиновом электроде. В централизованных лабораториях эту систему обычно используют для срочного определения глюкозы в пробах крови.

С другой стороны, в табл. 37.4 представлен глюкометр — небольшой переносной прибор с одноразовым элементом для количественного определения глюкозы по реакциям





При окислении окраска хромогенного реагента меняется, что и используется для количественного определения имеющейся глюкозы. Отметим разницу в стоимости, весе и предварительной обработке проб.

Рынок приборов, используемых вне клиники, обнаруживает все признаки ранней фазы роста. Объем продаж на рынке биосенсоров меньше, чем на рынке оборудования и реагентов для клинической биохимии, но быстро растет. Важное значение здесь имеют патентная защита и патентованная технология. Действительно, биосенсорная техника еще только развивается, и для небольших инновационных компаний здесь имеется много возможностей.

37.3. Ветеринария

Ветеринария связана с диагностикой и лечением животных, разводимых как с коммерческими целями, так и в качестве домашних животных. Ежегодный объем продаж на ветеринарном рынке США составляет 5–6 млрд. долл. Правда, сюда включены антибиотики, вакцины, витамины, общее ветеринарное обслуживание, кормовые добавки, такие как аминокислоты, стимуляторы роста, гормоны и стероиды. Конечно, диагностические тесты составляют лишь небольшую часть общих расходов – вероятно, 100–200 млн. долл. Таким образом, существующий ветеринарный рынок очень мал по сравнению с рынком здравоохранения.

Биосенсоры, очевидно, имеют много потенциальных приложений в ветеринарии. Это особенно относится к тем устройствам, которые прочны, легки в обращении и пригодны для использования в условиях низкого технического уровня. Однако многие потенциальные пользователи совершенно незнакомы с диагностическими аналитическими методами. Кроме того, антисанитарные условия фермы или скотобойни не выдерживают сравнения с условиями домашнего содержания или поликлиники. Поэтому новые приборы должны быть особенно надежными и простыми («дружелюбными») для пользователя. Кроме того, нельзя недооценивать значительных расходов, связанных с обучением потребителя, созданием новых каналов распределения, а также обслуживания, ремонта и регулировки приборов. Следовательно, прогноз здесь менее благоприятен, чем в случае рынка здравоохранения. Действительно, недоступно высокая стоимость создания рынка препятствует тому, чтобы коммерческие организации выпускали какие-либо товары специально для этого рынка. Здесь мы скорее увидим фирмы, разрабатывающие продукты для целей здравоохранения и затем слегка модифицирующие их для использования в ветеринарии. Такая модель развития рынка уже существует. Например, отделение Ames фирмы Miles Laboratories Inc. (Экхарт, Индиана) сейчас продает на ветеринарном рынке некоторые медицинские диагностические тесты.

37.4. Контроль ферментационных и других технологических процессов

Границы рынка приборов для контроля ферментационных и других технологических процессов выходят далеко за область компетенции автора. Можно, однако, утверждать, что в этой области имеется ряд потенциальных приложений биосенсоров. Они включают непрерывное наблюдение и контроль промышленных отходов (таких как метан, диоксид и оксид углерода), микробных загрязнений в замкнутых процессах (например, в отопительных и вентиляционных системах, водопроводных сетях), контроль стандартных ферментационных процессов путем мониторинга содержания суб-

стратов, роста биомассы микробов и образования субстратов. Биологически чувствительный элемент биосенсоров может обеспечить биосенсорные приборы определенными преимуществами перед их конкурентами. Например, ферменты или иммунохимические компоненты обладают в высшей степени уникальной специфичностью, сопряженной со способностью выбирать молекулу-мишень из чрезвычайно сложной смеси других молекул. Биосенсоры также являются высокоспецифичными. С другой стороны, они весьма чувствительны к температуре, рН, осмотическому давлению и к тому же относительно быстро выходят из строя.

Промышленные процессы по своей специфике также исключительно не подходят для биосенсоров. Например, во многих процессах биосенсоры должны располагаться в удаленных частях системы, где трудно обеспечить доступ для замены тонких элементов биосенсоров через определенные промежутки времени. Во многих процессах приготовления пищи для предотвращения микробного загрязнения требуется паровая стерилизация системы. Ясно, что такая процедура несовместима с биосенсором, если только не имеется специального отвода от основного процесса для проведения анализа. Собственный опыт автора говорит, что специалисты по ферментационным процессам не хотят усложнять свою хорошо отработанную процедуру паровой стерилизации такой в сущности безвредной вещью, как небольшая линия, ведущая к биосенсору.

37.5. Заключение

Читатель вполне может сделать вывод, что коммерческие возможности биосенсоров существенно меняются при переходе от одних приложений к другим. Коммерческому будущему биосенсоров, предсказываемому многими, может угрожать целый ряд непредвиденных осложнений, в том числе плохие отзывы о товаре, усиленная конкуренция, отсутствие потребности, технические трудности, законодательные или патентные проблемы, плохой маркетинг или сбыт, плохой дизайн товара. Путь к коммерческому успеху биосенсора лежит через анализ рынка, глубокое понимание потенциальных преимуществ, финансовую поддержку, всеобъемлющий маркетинг и сбыт, целеустремленность. При условии удачных коммерческих решений потенциал этих приборов действительно очень велик. Однако коммерческое продвижение биосенсоров – это область приложения сил не для тех, кто согласен со старым изречением Кромвеля о том, что идущий дальше всех не знает, куда ведет дорога!

Предметный указатель

- Авидин 75
Авогадро число 356
Автокорреляционная функция 363, 544, 546
Аденозин
- конденсатор IgМОП, отклик на 437
- сенсор на основе клеток тонкой кишки
мышы 35, 40
Аденозиндеаминаза 109, 437
- иммобилизация 83
- как ферментная метка 62
Аденозиндифосфат
- сенсор на основе мышечной ткани кролика
35, 40
- характеристики сенсоров 45
Аденозинтрифосфат (АТФ) 490
- Н⁺-АТРаза 377
- - термофильная 378
- детекторы 500
- микробиосенсор 375, 378
- определение
- - в клинической практике 377
- - в микробиологических производствах 377
- - глюкозным электродом 216
- - с помощью люциферазы 490
- - тканевым биосенсором 35, 40
- - ферментным термистором 463
Адмиттанс 344
- понятие о 346
Адмиттансная диаграмма 349, 354
Адсорбция
- для модификации электрода 174
- микроорганизмов 249
Азид натрия 40, 44, 53
Азурин 208, 221
- константа скорости реакции с цитохромом с
209
Акриданы 496
Акридиниевые эфиры 497, 501
Акридиния соли 496, 497
Аксоны нервных клеток, индуктивность 346
Активное сопротивление электрохимической
ячейки 351
Активность фермента
- кажущаяся, фотометрическое определение
134
- определение ферментным термистором 467
- сенсоры для определения 276
Активный уголь как адсорбент 84
Акустическая микроскопия 441
- сканирующая 452
- способ создания изображений 452
Акустическая резонансная денситометрия 441,
452 сл.
Акустические детекторы 11
Акустический анализ неомогенных жидкостей
450
Акустический импеданс 441
Акцепторы
- протонов 325
- электронов 203, 325
- - нефизиологические 203
Аланин 104
- определение в крови 570
D-Аланин 166
Аланинаминотрансфераза 266
- активности определение в сыворотке 277-
диагностика миокардита и гепатита 277
Аланиндегидрогеназа 434
Алкогольдегидрогеназа 110, 219, 269, 434
- константа скорости реакций с ферроциний-
ионом 207
- модификация лизиновых остатков 107
Алкогольоксидаза 269, 463
- из *Candida boidinii* 269, 466
- из *Hansenula polymorpha* 269
- - сенсор этанола на основе 269
- иммобилизация 83
Аллостерические эффекторы 507
Альбумин 377, 510
- бычий сывороточный 40, 48 сл., 78, 108,
134, 333, 519, 528, 530
- определение ферментным термистором 463
- человека, сывороточный 61, 533
Альгинат натрия 80
Альгинатный гель 80, 249
Амигдалина определение 120
- ферментным электродом 123
Амидов определение амперометрическими
сенсорами 257
Амилаза
- диагностические тесты на 571
- измерение активности, в педиатрии 16
- определение в крови 575
α-Амилаза 274, 276
- анализатор 276
- бактериальная, измерение активности 277
- для диагностики острых панкреатитов 276
- определение в крови и моче 276
Амилоидоз 578
6-[N-(4-Аминобутил)-N-этил]амино-2,3-ди-
гидро-1,4-фталазин-1,4-дион (АВЕI), как
хемилюминесцентная метка 497
Аминогликозидные антибиотики, определение
флуоресцентное 508
Аминокислотная деаминаза 426
D-Аминокислотная оксидаза 122, 166, 187
L-Аминокислотная оксидаза 122, 127, 166,
187, 215
- константа скорости реакций с ферроциний-
ионом 207
Аминокислотные оксидазы 270
L-Аминокислот сенсор 209
Аминокислоты 326
- биосенсоры амперометрические 270
- определение 120
- - амперометрическими сенсорами 258
- - в крови 569
L-, D-Аминокислоты, ферментный электрод
116, 122
- Аминомасляная кислота 181
- вывод 181
γ-Аминопропилтриэтоксисилан 379, 529
Аминотрансферазы, определение активности
277
Аммиак
- IgМОППТ, чувствительный к 453, 438
- определение в проточной системе с IgМОП
434
- - в крови и сыворотке 434
- - в педиатрии 434
- - помехи 435
- PdМОППТ, чувствительный к 425, 428
- электрод, чувствительный к 62, 120
- - на основе нонактина 119
- - определение креатинина 126
Аммиака сенсор 25, 31
- для контроля процессов ферментации 446

- Аммонийселективный электрод на основе металлической сурьмы 126
- Амниоцентез 73
- Амперометрические биосенсоры, аппаратура 257
- Амперометрические сенсоры
- защитная мембрана 140
 - адсорбция белков на электроде 140, 141
- Ампициллин
- влияние на энтеробактерии 432
 - устойчивость *E. coli* к 432
- Антибиотики
- диагностические тесты на 571
 - определение 238
 - - аминокликозидных, флуоресцентное 508
- Антигемоглобиновая антисыворотка кролика 530
- Антигены 513, 583
- введение метки 57
 - определение 57
 - - методом ТФИСА 464
 - - реагенты для 584
 - предел обнаружения с ИМПТ 414
 - с хемилюминесцирующей меткой 497
 - ферментные иммуносенсоры 274
- Антиконульсантов определение в неврологии 572
- Антитела 57, 513, 583
- введение метки 57
 - FITC-меченные 531
 - к возбудителям сифилиса, иммуноэлектрод на 416
 - определение 57
 - хемилюминесцирующая метка 497
- Антитело-антиген, монозитописические реакции 549
- Антител ферментные иммуносенсоры 274
- α -1-Антитрипсин 73
- α -Антитрипсиндефицит, диагностика 71
- Антиромбин-3 73
- Апираза 463
- Аргинин 106
- Аргоновый лазер 475
- Артрит, реагенты для диагностики 584
- Аскорбат 252
- Аскорбатоксидаза 463, 465
- иммобилизация 82
- Аскорбиновая кислота 78, 267, 326
- определение ферментным термистором 463
 - помехи определению глюкозы 259
- Аспарагин 104
- L-Аспарагин
- конденсатор IgМОП, отклик на 437
 - определение в крови 436
 - ферментный электрод 122
- Аспарагиназа 122, 437, 438
- иммобилизация 82
 - как ферментная метка 62
- L-Аспарагиназа 436
- Аспарагиновая кислота 106
- Аспартаза 437
- L-Аспартат, конденсатор IgМОП, отклик на 437
- Аспартатаминотрансфераза
- активности определение в сыворотке 277
 - диагностика миокардита и гепатита 277
 - диагностические тесты на 571
 - измерение активности 16
 - оценка глубины инфаркта 16
- Аффинная хроматография 467, 507
- Ацетальдегид 170
- Ацетилхолин
- гидролиз, изменение энтальпии при 461
 - ФПТ, чувствительный к 408, 411
- Ацетилцеллюлоза 327
- Ацетилцеллюлозные мембраны 16
- Ацидос
- диагностика 264
 - молочнокислый 264, 570
- Базовые электроды 122
- Бактериальная люцифераза
- в ферментативном анализе 491
 - иммобилизованная 501
 - клонирование 501
- Бактериальной активности измерение в продуктах питания 241
- Бактериальные инфекции, определение в полевых условиях 500
- Бактерии метанотрофные 97
- Бактериофаг
- M13 95, 1103
 - Φ X174 102
 - лямбда, жизненный цикл 93 сл.
- Бактериурия 542
- Белки 141
- адсорбция на электроде 140
 - иммобилизация
 - - ковалентным связыванием 528, 529
 - - методика 529
 - - на кварцевых или стеклянных поверхностях 528
 - - физической адсорбцией 528
- Бензиловый фиолетовый как медиатор 243
- Бензо-15-краун-5, определение антител 62
- Бензол-1-аргининамид, мольные энтальпии реакций, катализируемых ферментами 457
- 1,2-Бензофеноноксазидин-7 177
- Бензохинон как акцептор электронов 465
- Бетаиновый альдегид 166, 169
- Билирубин 78, 514
- помехи определению глюкозы 259
- Био число 141
- Биологические жидкости, клинический анализ 238
- Биоломинесцентные сенсоры 481
- Биоломинесценция 481
- морских организмов 489
 - рачков *Cypridina hilgendorffii* 488, 493
 - - механизм 488 сл., 493
 - светляка 489, 494
- Биотин-авидиновая система 498
- Биохимическое потребление кислорода 30
- определение методом JIS 31
 - сенсор на основе *Trichosporon cutaneum* 30
- Блоттинг-метод *Sauzerna* 67, 94
- методика 69
- Больцмана константа 356
- БПК см. Биохимическое потребление кислорода
- Брадикардия 296
- Бриллиантовый кризоловый синий как медиатор 243
- Бродильных процессов контроль 262
- Бромидный электрод 119
- Бромизоаллоксазины 110
- БСА см. Бычий сывороточный альбумин
- Бутанола определение, ферментным термистором 467
- Бутиламин, конденсатор IgМОП, чувствительность к 435
- Бутлера-Фольмера уравнение 138
- Бычий гамма-глобулин 519

- меченный флуоресцеином 519
- Бычий сывороточный альбумин 40, 48 сл., 78, 134, 333, 519, 528, 530
- меченный флуоресцеином 519
- модификация лизиновых остатков 108
- Бычий фактор VIII 548
- Бэрингера метод определения лактата 265
- Вакуумные фотоумножители 499
- как детекторы хемилуминесценции 498
- Валиномицин 118, 296, 403
- в калийселективной мембране для ИСПТ 403
- Ван-дер-ваальсовы силы 84
- Ветеринария 580
- диагностические тесты 584
- Взаимодействие субстрат-фермент, модели 54
- Винилферроцен, константа скорости реакции с восстановленной глюкозооксидазой 208
- Вирус табачной мозаики 548
- изучение методом ФКС 548
- Вирусный менингит, диагностика 264
- Вирусов определение 57
- Витамины
- В₁, сенсор 25
- С, определение 465
- Водители ритма сердца 574, 578
- Водород, PdМОППТ, чувствительный к 426, 431
- для контроля микробиологических процессов 431
- изучение влияния ампициллина на энтеробактерии 432
- изучение культуры *E. coli* 432
- Волноводы 519, 525
- Волоконная оптика 475, 505, 538
- химическая сенсорная система 475
- Волоконно-оптические сенсоры 538
- внешние 538
- внутренние 538
- достоинства 539
- Волчанка, реагенты для диагностики 584
- Вольтамперометрия 146
- с линейной разверткой 146
- для обработки электрода 146
- циклическая 146, 182
- для обработки электрода 146
- Вращающийся дисковый электрод 140, 162, 177, 191
- гидродинамика 191
- влияние шероховатости поверхности 193
- для изучения адсорбции 198
- равномерно доступный 192
- с нанесенной мембраной 140
- Время релаксации 349, 352
- Вставочная инактивация 93 сл.
- Высокоэффективная жидкостная хроматография 140, 469
- Газоаммиачный электрод 125
- Газочувствительные полесвые транзисторы (ГПТ) 418
- биосенсоры на основе 425 сл.
- с висцим затвором 419
- с иридиевым затвором 430
- с палладиевым затвором 419
- чувствительный к NH₃ 428
- Газочувствительные электроды 120
- Газы крови
- непрерывный мониторинг 289 сл.
- определение 568
- в отделении интенсивной терапии 569
- с диагностическими тестами 571
- Галактоза 17, 380
- в виде дисахарида 262
- концентрация в сыворотке 262
- определение 263
- в контроле ферментационных процессов 463
- с кислородной оксидоредуктазой 16
- ферментным термистором 463
- β-Галактозидаза 462
- Галактозооксидаза 17, 263, 463
- галактозы определение 263
- константа скорости реакций с ферроциний-ионом 207
- лактозы определение 263
- фруктозы определение 263
- электрод на основе 17
- β-Галактооксидаза 465
- D-Галактозооксидаза, иммобилизация 82
- Галактоза
- определение 465
- сенсор 209
- Гаптены 516, 531
- низкомолекулярные, антитела к 507
- Гармонический анализ 344
- Гастроэзофагеальный рефлюкс 297
- Гексануклеотидных праймеров метод 68
- Гексацианоферрат (II) 267
- Гексацианоферрат (III) как акцептор электронов 262
- Гексокиназа 226, 260, 457, 463
- иммобилизованная 464
- Гели для иммобилизации 249
- Гельмгольца часть двойного электрического слоя 413
- Гель-фильтрация 467
- Гельэлектрофорез
- выделение ДНК 68
- Гемоглобин 530, 577
- изменение спектра при связывании кислорода 508
- Гемоглобинопатия, диагностика с помощью ДНК-зондов 73
- Гемофилия 72
- диагностика с помощью ДНК-зондов 73
- Гентамицин
- определение
- ферментным термистором 463
- флуоресцентное 508
- тест на, объем продаж 583
- Гепатит
- диагностика 276 сл.
- тест на, объем продаж 583
- Гепатита В вирус 145
- антиген к 571
- - поверхностный 145
- - определение 145
- Гибридизация ДНК, методы 67
- Гидразиды циклические 497
- Гидразина окисление 266
- Гидрогеназа 425, 426, 430
- в чувствительном к водороду PdМОППТ 431
- из *Alcaligenes eutrophus* H16 431
- иммобилизация 431
- определение NADH и NAD⁺ 433
- Гидроид *Obelia*, биоломинесценция 492
- накопление люциферина 492
- Гидроксиапатит как адсорбент 84
- 3-Гидроксипутират 574
- 2-Гидрокси-1,4-нафтохинон (HNQ) как медиатор 243, 246

- 8-Гидрокси-1,3,6-пирентрисульфоновая кислота, тринатриевая соль (ГПТС) 483
 N-Гидроксисукцинимидиловый эфир 497
 - как хемилюминесцирующая метка 497
 Гидролазы 272
 - иммобилизованные
 - - активность 112
 - эфиров холестерина 272
 Гидрохиноны 218
 Гипервитаминоза диагностика 270
 Гипергликемия 297 сл., 339, 573
 Гиперинсулинемия периферическая 319
 Гиперкалиемия 296
 Гиперлипидемия, диагностика 272
 Гипогликемия 16, 297, 339, 572
 Гипоксантин
 - как индикатор гипоксии 18
 - определение с кислородной оксидоредуктазой 16
 Гипоксемия 292
 Гипоксия у новорожденных 290
 Гистидин 104, 106
 Гликемия 318, 339
 - регуляция у больных диабетом 331, 341
 Гликолевая кислота 215
 Гликолята сенсор 209
 Гликолятоксидаза 215
 - константа скорости реакций с ферроциний-ионом 207
 α -1-Гликопротеин кислый, определение 145
 Глина как адсорбент 84
 Глицерин 17
 - определение с кислородной оксидоредуктазой 16
 Глицериндегидрогеназа 134, 273
 - редокс-электрод на основе 134
 Глицеринкиназа 273
 Глицериноксидаза 273
 Глицерофосфатоксидаза 273
 Глицин 104
 - Глобин 66
 Глобиновая мРНК, источник 67
 Глутамат
 - микробiosенсор 375
 - сенсор для микробиологической и пищевой промышленности 381
 L-Глутамат
 - биосенсор амперометрический 270
 - конденсатор IgMOP, отклик на 437
 Глутаматдегидрогеназа 122, 126, 437
 L-Глутаматдегидрогеназа 436
 Глутаматный сенсор, определение аминотрансфераз 277
 Глутаматоксидаза 381
 L-Глутаматоксидаза 270, 277
 Глутамин
 - определение 120, 127
 - сенсор
 - - на основе клеток кортекса почки свиньи 35, 53
 - - аналитические характеристики 39
 - - селективность 37
 - - срок службы 37
 L-Глутамин, ферментный электрод 122
 Глутаминаза 35, 53 сл., 122, 127
 Глутаминат 181
 - вывод 181
 - сенсор на основе мякоти желтой тыквы 35, 48
 Глутаминатдекарбоксилаза 28, 48
 Глутаминовая кислота 106
 - определение 120
 - сенсор 25
 - - на основе *Escherichia coli* 28
 L-Глутаминовая кислота
 - определение в пищевой промышленности 381
 - ферментный электрод 122
 Глутаровый альдегид 40, 48 сл., 85, 89, 125, 134, 327, 376, 379, 381, 438, 460, 529
 Глутатион, помехи определению глюкозы 259
 Глутатионредуктаза (диафораз) 109, 209, 215, 231, 273
 - константа скорости реакций с ферроциний-ионом 207
 - модификация лизиновых остатков 110
 Глюкагон, скорость вливания 340
 Глюкоамилаза
 - иммобилизация на
 - - пористом силикагеле 80
 - - крахмале 80
 - соиммобилизация с глюкозооксидазой 274
 Глюкоза 15, 252, 286, 377 сл.
 - в крови непрерывный мониторинг 289
 - - чрескожный 298
 - в подкожной ткани
 - - концентрация 298
 - - мониторинг 298
 - диагностические тесты на 571
 - константа связывания с Соп А 516
 - контроль содержания в крови 145
 - концентрация в крови
 - - регуляция инсулином 572
 - - у тяжелобольных людей 576
 - микробiosенсор 375
 - молярные энтальпии реакций, катализируемых ферментами 457
 - неинвазивный мониторинг во влаге глаза 326
 - окисление 239
 - содержание в крови, контроль 17
 - - при диабете 17
 - телеметрическая система мониторинга 339
 - уровень в крови после еды 319
 - ферментный электрод для определения 122
 - ФПТ, чувствительный к 408
 α -Глюкозидаза 276
 β -Глюкозидаза 123, 463
 Глюкозный сенсор
 - волоконно-оптический 509
 - для мониторинга in vivo 332
 - дисковый электрохимический 331
 - игольчатый 573
 - - для мониторинга в тканях 331, 334, 337
 - имплантируемый 316, 320
 - in vivo, управление системой подачи инсулина 577
 - Кларка и Лайонса 322
 - на основе глюкозооксидазы 331
 - с бензохиноном в качестве кофактора 325
 - срок службы
 - - in vitro 334
 - - in vivo 336
 - температурный коэффициент отклика 334
 Глюкозный электрод 12, 16, 149, 214
 - автоматизированный, с микрокалькулятором 560
 - in situ в биореакторе 282
 - на основе глюкозооксидазы с каталазой 282
 - проверка воспроизводимости и линейности 564
 - фирмы YSI 16
 Глюкозоанализатор 15, 260

- клинический 585
- фотодиодный 500
- Глюкозодегидрогеназа 96, 231, 326
- апофермент 96
- константа скорости реакций с ферроциний-ионом 207
- технология получения 96
- Глюкозоизомераза 326
- Глюкозооксидаза 14, 122, 133, 143, 149, 160, 187, 206, 208, 214 сл., 222, 226, 231, 239, 259, 262, 379, 457, 463, 555, 585
- амперометрический сенсор на основе, имплантируемый 301
- апофермент 325
- в комбинации с электродом *Кларка* 14
- в фторидном сенсоре 50
- в электродах из NMP⁺TCNQ⁻ 222
- из *Aspergillus niger* 134, 283, 332
- иммобилизация ковалентная 231
- как ферментная метка 58
- константа скорости реакций с ферроциний-ионом 207
- молекулярная структура 101
- сопряжение с электродами из NMP⁺TCNQ⁻ 221
- реакции с производными ферроцена 208
- редокс-электрод на основе 134
- сенсор на основе, модифицированный ферроценом 262
- флавиновый редокс-центр 149
- электрод на основе 215
- - воспроизводимость поверхностных потенциалов 136
- - платиновый 136
- - ферментный 120
- электрохимическое окисление 164
- β -Глюкозооксидаза 462
- β -D-Глюкозооксидаза 320
- D-Глюкозооксидаза, иммобилизация 82
- Глюкозооксидазные мембраны 555
- сравнение, при помощи микрокомпьютера 564
- Глюкозо-6-фосфат 216, 275
- Глюкозо-6-фосфатаза 326
- Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа 73, 226, 260
- Глюкозы определение
 - в биологических жидкостях 120
 - в крови 258, 260, 379
 - в отделении интенсивной терапии 569
 - - люминесцентное с акридиниевыми эфирами 501
 - - непрерывное 570
 - - при диабете 568
 - - при помощи микроэлектрода 379
 - в моче 258
 - в паточке 23
 - в педиатрических учреждениях 16
 - в потоке in vitro 15
 - в сыворотке 260
 - для диагностики диабета 127
 - in vivo 15
 - с глюкозооксидазой, чувствительность 462
 - с кислородной оксидоредуктазой 16
 - с люциферазой 491
 - с микробным сенсором 21, 23
 - спектрофотометрическое 226
 - ферментным термистором 463
 - ферментным электродом 116, 120, 122
 - с микрокомпьютером 558
 - энталпиметрическим методом с гексокиназой 464
- Глюкозы сенсор
 - амперометрический 258
 - - для технологического контроля 258
 - волоконно-оптический биоаффинный 302
 - имплантируемый 18, 298, 300
 - - конфигурация топливного элемента 300
 - испытания in vivo 302
 - на основе
 - - глюкозооксидазы 96
 - - конкурентного связывания 480
 - с электрохимической генерацией кислорода 262
- Глюкокиназа 326
- Глюкометр 585
- Глюконовая кислота 287
- Глюконолактон 134, 239, 585
- Глюкооксидазная индикаторная бумага 569, 570, 572
 - для контроля больных диабетом 572
- Гомеостазис организма 316
- Гомогенный иммуоферментный анализ 520
- Гонадотропин человека
 - хемилюминесцентное определение 497
 - хорионический 59, 61
 - - биосенсор 59
 - - определение 59
 - - тест на, объем продаж 583
- Гониометрические методы 542
- Гормон роста человека 73
- Гормонов определение 57, 497
- Грам-положительные и грам-отрицательные микроорганизмы 241, 250
 - α -дисперсии 357
 - Грамицидин 548
- Графт-полимеризация 81
- Группы крови определение 548
 - наборы для 584
- Гуанина сенсор
 - на основе ткани печени кролика 35, 45
 - оптимизация 45
 - селективность 47
- Гуи-Чапмена* часть двойного электрического слоя 413
- Дамколера* число 143
- Двойного лучепреломления метод 542
- Двойной электрический слой 349
 - *Гельмгольца* часть 413
 - *Гуи-Чапмена* часть 413
 - теория 413
- Деаминазы 120
 - аминокислот 426
- Дегидрогеназы
 - как ферментная метка 60
 - NAD-зависимые 216, 248
 - NAD⁺ как кофермент 175
 - NAD(P)⁺-независимые 215
- Дегидролюциферин 489
- Декарбоксилазы 120
- Декстран 109, 219
 - меченный флуоресцеином (FITC-декстран) 480, 509, 515
 - - константа связывания с Соп А 516
- Декстраназа 85
- Денатурация 101
 - фермента 213
- Деоксигемоглобин 259
- Деполаризации флуоресценции метод 512
- Джафе* оптический метод 267
- Джонсоновский шум 311
- Диабет 18, 127
 - анализ крови больных 209

- использование ферментных электродов 18
- сахарный 296, 569, 572
- - диагностика 258
- - инсулин-зависимый 297, 316, 340
- - подкожное вливание инсулина 340
- - регуляция гликемии 331
- Диаграмма энергетических зон кремния 385
- Диаграммы свободной энергии 157
- Диализатор 257
- 1,8-Диамино-4-аминометилпептан 376, 381
- о-Дианизин 226
- Диафороза см. Глутатионредуктаза
- Диацетат гексидина как консервант 48
- Диацетилцеллюлоза 332, 332
- Дибензо-18-краун-6, определение антител 62
- Дигидроксиацетон 17, 263
- Дигидроникотинамиды, окисление 110
- Дигидрофолатредуктаза 105
- из печени цыпленка 107
- Дигоксин 571
- антитела к 62
- тест на, объем продаж 583
- Дидецифосфат кальция как жидкий ионит 118
- Дидодециламин 446
- Диметил-триметилферроценметодат 231
- 1,1-Диметилферроцен 214, 231, 232, 301
- константа скорости реакции с восстановленной глюкозооксидазой 208
- Динитрофенол 531
- Диоксазаны 496 сл.
- Диоксида азота сенсор 25
- Диоксид кремния 376, 384, 387, 397
- термически выращенный 376
- Диоксид углерода
- непрерывный мониторинг 586
- парциальное давление в артериальной крови 290
- сенсор
- - для контроля ферментационных процессов 446
- - растворенного 446
- - электрод, чувствительный к 62, 120, 463
- Диоктадециламин 446
- 4,4'-Дипиридил 142, 195, 220
- адсорбция на золотом электроде 199
- Дипольный момент 356
- Дисковый электрод с кольцом 165, 191
- Дисперсия диэлектрической проницаемости 355, 357
- Дисульфиды 141
- Дитиолы, окисление 110
- Диуретики 296
- Дифференциального светорасеяния метод 542
- Дифракционное рассеяние света 542
- в приближении Фраунгофера 542
- Диффузии коэффициент 140, 151, 167, 178, 188, 192, 252
- Диффузия
- внешняя 138
- внутренняя 138
- скорость 138
- Дихлорфенол как медиатор 264
- Диэлектрическая постоянная пьезоэлектрика 445
- Диэлектрическая проницаемость 351 сл.
- дисперсия 355
- Диэлектрическая спектроскопия 344
- оценка динамики белков 365
- Диэлектрические потери 352
- Диэлектрический затвор ИСПТ 375 сл., 384, 397
- Диэтиламин, конденсатор IgМОП, чувствительность к 435
- Диэтилтриаминопентауксусная кислота 81
- ДНК
- изучение методами светорасеяния 547
- клонирование 93
- конформация спирали 547
- определение 120
- рекомбинантные 102
- рестрикция эндонуклеазами 89
- секвенирование, методы 94
- ДНК-аза-1 68
- ДНК-зонды 66
- биотин-dVTP как метка 67
- геномные 67
- для диагностики 73
- олигонуклеотидные 68
- радиоактивные метки 67
- ДНК-лигаза 92
- ДНК-полимераза 96
- ДНК-полимераза-1 68
- из *Escherichia coli* 68
- Кленова фрагмент 68
- кДНК-зонды 67
- Допамин 181
- вывод 181
- сенсор на основе мякоти банана 35, 51
- Дрожжи 94
- Дыхательный коэффициент 243
- Емкость, математическое выражение 346
- Емкость двойного слоя 187
- Жгутиковые *Pyrocystis lunula* 493
- люциферин из 493
- Желатин/коллагеновый гель 80
- Жесткость на сжатие 449
- Жидкостная хроматография 145
- Жидкостные ионообменные электроды 117,119
- Заряженных поверхностных групп мутагенез 105
- Здравоохранение 580
- Износ ферментного электрода 125
- Изолейцин-3 105
- Изолюминол 497
- Изотерма Лэнгмюра 513
- Изогиоцианат 497
- как хемилюминесцирующая метка 497
- Изоцитрата определение, в производстве лимонной кислоты 270
- Изоцитратдегидрогеназа 209, 270
- NADH-зависимая 209
- Иммобилизации белков методы 528
- на кварцевых или стеклянных поверхностях 528 сл.
- - ковалентное связывание 528, 529
- - физическая адсорбция 528
- Иммобилизация фермента в электродах 121
- Иммуноанализ 507, 549
- вольтамперометрический 60
- - больших молекул 61
- - гетерогенные методы, чувствительность 534
- - гомогенные методы 498
- потенциометрический ионофорный модуляционный 62
- принцип метода 57
- радиоактивные метки 507
- с переносом энергии флуоресцентного возбуждения 511
- с поляризацией флуоресценции 519

- флуоресцентные метки 507
- электрохимический, классификация методов 58
- Иммуноглобулин 488, 521
 - анти-, овцы 532
 - кролика 62
 - человека 531
 - иммунофлуориметрическое определение 532
- Иммунология, объем продаж реагентов 583
- Иммунопротеинов определение, реагенты для 584
- Иммунорадиометрический анализ 57
- Иммуносенсор электрогравиметрический 447
- Иммуноферментный анализ 57, 145, 497
 - методики, рынок сбыта 583
 - фактора VIII 59
 - чувствительность 145
- Иммуноферментометрический анализ 57
- Иммунохимически чувствительные полевые транзисторы (ИМПТ) 412
 - с толстыми полимерными мембранами 416
- Импеданс 344
 - акустический 441
 - Варбурга 350
 - биологических систем 354 сл., 359
 - интерпретация 349
 - описание, диаграмма Коул-Коула 354
 - передаточная функция 364
 - понятие о 346
 - реальная и мнимая части 346
 - вычисление 349
 - электрод-электролитной системы 309
 - амплитудная и частотная зависимость 310
 - емкостная и омическая составляющие 309
 - установка для определения 309
- Импедансная диаграмма 349
- Импедансная плетизмография 358
- Импедансометрия 364
- для контроля хроматографических элюентов 358
- Имплантируемые сенсоры 12
 - глюкозы 298, 300
 - для системы подачи инсулина 137
 - с электродами игольчатого типа 262
- Импульсная вольтамперометрия 181, 344
- Импульсная полярография 146, 184
 - дифференциальная 184, 187
 - для обработки электрода 146
 - принцип метода 184
- Инвертаза 263, 463, 465
- Ингибирования константа 107
- Ингибиторы холинэстеразы, определение 470
- Индолпропионовая кислота 109
- Индофенол как медиатор 264
- Индуктивность, математическое выражение 346
- Инсулин 297, 316, 572
 - агрегация 319
 - алгоритм внутривенного вливания 340
 - вырабатывающие клетки 297
 - дозировка 575
 - определение ферментным термистором 463
 - подкожное введение 569
 - регуляция уровня глюкозы в крови 572
 - система подачи 137, 577
 - скорость вливания 340
 - уровень в крови после еды 319
- Инсулина система вливания 262
- Инсулинемия физиологическая 340
- Инсулиновая терапия 298, 316
- Инсулиновый насос 12, 18, 316, 569 сл.
 - управление 574
- Интактные клетки, иммобилизация 470
- Интегральные схемы 384
- Интроны 89
- Инфаркт миокарда 16, 276, 296
 - диагностика 216, 276
- Инфицирование фермента 286
- Иодидный электрод 62, 119
- Ионные затворы 181
- Ионообменная хроматография 467
- Ионоселективные полевые транзисторы (ИСПТ) 296, 375, 401
 - гетерогенные мембраны 404
 - диэлектрический затвор 376
 - истоковая область 376
 - конструкция 376
 - полимерные мембраны 403
 - с висящей сеткой 406
 - стандартные (СППТ) 376
 - твердотельная мембрана из нитрида кремния 403
 - ферментные 376
- Ионоселективные электроды 384
- Искусственная поджелудочная железа 262, 265, 297, 318, 331, 335, 341, 569, 574
 - в системе с замкнутым контуром 341
 - для ношения пациентом 340
 - алгоритм вливания инсулина и глюкагона 340
- Искусственного кровообращения аппарат 294
- Калий
 - в крови, непрерывный мониторинг 289, 296
 - диагностические тесты на 571
 - определение 568
 - валиномициновым электродом 119
 - в крови 569, 572
 - в моче 569
 - в сыворотке крови 119
- Калийселективный электрод 62, 118
 - на основе валиномицина 118 сл.
 - определение калия в сыворотке 119
- Калориметр с малым объемом 457
- Кальций
 - диагностические тесты на 571
 - определение в крови или подкожной ткани 569
- Кальцийселективные электроды 118 сл.
 - на основе жидкого ионита 118
- Каолинит как адсорбент 84
- Карагенановый гель 249
- Карбоангидраза
 - модификация лизиновых остатков 108
- Карбодимид 250
- Карбоксиоксидаза А 106
- Карбоксипептидаза А 106
 - ацетилирование тирозиновых остатков 109
- Кардиоверсия 574
- Кардиолипидин 416
- Карликовость, диагностика с помощью ДНК-зондов 73
- Карциноэмбриональный антиген 59
- Каталаза 15, 59, 134, 274, 457, 463, 466
 - из печени быка 283
 - иммобилизация 82
 - как ферментная метка 58
- Катехоламины 141
 - контроль in vivo 144

- Квазиупругого рассеяния света спектроскопия (СКУРС) 543
- изучение биологических макромолекул (ДНК) 547
- Квантовый выход
- флуоресценции 494
 - хемилюминесценции 494
- α -Кетоадипиновая кислота 62
- Кетоацидоз 298
- диабетический 573, 577
 - - диагностика 270
- α -Кетоглутарат 126
- Кетонов определение в крови 577, 569
- Кинематическая вязкость 192
- Кислая фосфатаза 75
- Кислорода давление в крови
- артериальное 289 сл., 292
 - - трансконъюнктивное 294
 - - чрескожное измерение 290
 - смешанное венозное 292
 - смешанное венозное при насыщении 292
 - - непрерывный мониторинг 296
- Кислородные оксидоредуктазы 15, 17
- Кислородный микроэлектрод, характеристики 381
- Кислородный платиновый электрод 13
- Кислотная фосфатаза 50, ингибиторы 50
- Кислотно-основной индикатор 473
- Кларка кислородный электрод 14, 20, 23 сл., 144, 264, 266, 270, 293, 322
- введение в артерию новорожденных 290
- Кленова фрагмент 68
- Клинический анализ, при помощи микробных сенсоров 254
- Клонирование в *E. coli* 97
- Ковалентное присоединение редокс-медиаторов 174
- Коллаген 73, 548
- как адсорбент 84
- Коллодий как адсорбент 84
- Комбинационное рассеяние
- анализ биологических систем 542
 - исследование полимеров 547
 - спектроскопия 542
- Комплексная проницаемость 352
- Комплексы с переносом заряда 141, 218, 221
- электроды на основе 221
- Комплексы с переносом электрона 79. 84
- Кондуктометрические детекторы 11
- Кондуктометрия 358
- Конканавалин А 61, 302, 326, 480, 516
- в глюкозном сенсоре 509, 515
 - закрепление на кварцевых поверхностях 530
 - как рецептор для сахаров 509
 - константа связывания с глюкозой 516
- Конкурентное связывание, сенсор на основе 480
- Константа скорости реакции 208
- Концевого мечения метод 68
- Коронарный тромбоз 571
- анализ на креатинкиназу 571
- Кортизол, тест на, объем продаж 583
- Кортизон
- определение в крови 62
- Котрелла уравнение 188
- интегральная форма 190
- Коул-Коула график 352
- Коул-Коула диаграмма 354
- Коул-Коула фактор 352, 355
- Коутецкого-Левича уравнение 194
- Кофактор PQQ 96
- Кофакторов детектирование 325
- Коферментов иммобилизация 113
- Коэффициент диффузии 140, 151, 167, 178, 188, 192, 252
- Коэффициент распределения в мембране 151
- Коэффициент рассеяния 354
- Коэффициент эффективности 196
- Крахмала определение в зерне и картофеле 274
- Креатина определение
- амперометрическими сенсорами 258
 - в биологических жидкостях 267
 - в сыворотке 267
 - для диагностики 267
- Креатина определение 126
- в сумме с креатинином 126
- Креатинамидиногидролаза 267
- Креатинамидогидролаза 126
- Креатинин 377
- диагностические тесты на 571
 - конденсатор IgMOP, отклик на 437
 - определение 120, 126, 436
 - - в биологических жидкостях 267
 - - в крови и подкожной ткани 569, 572
 - - в крови и моче 127
 - - в моче 569
 - - в сумме с креатином 126
 - - в сыворотке 267
 - - в сыворотке и моче 436
 - - для диагностики 267
 - - для характеристики функции почек 570
 - - ферментным термистором 463
- Креатининаза 126
- Креатининамидогидролаза 267, 126
- Креатининиминогидролаза 423, 436 сл., 463
- Креатинкиназа 16, 426
- диагностика коронарного тромбоза 571
 - диагностические тесты на 571
 - измерение активности 16, 209
 - - для оценки глубины инфаркта 16
 - определение 216
- Креатинфосфат 216
- Кречмана призма 523
- Критическая частота 348
- Крови анализ при диабете 209
- Крови консервирование, объем продаж реагентов 583
- Кругового дихроизма метод 542
- Ксантин 166
- определение с кислородной оксидоредуктазой 16
- Ксантиндегидрогеназа 109
- Ксантинооксидаза 166, 187, 216, 222, 231
- константа скорости реакций с ферроциний-ионом 207
- Ксантинпероксидаза, сопряжение с электродами из NMP+TCNQ- 221
- Культера счетчик 357, 364
- Лазер как источник света 538
- Лазерная доплеровская скоростиметрия 544, 546
- автокорреляционная функция интенсивности 546
 - комбинация с электрофорезом 548
- Лайнуивера-Бэка график 144
- Лактаза 463
- α -Лактальбумин
- модификация лизиновых остатков 108
- β -Лактамаза 105
- L-Лактатанализаторы 265
- Лактата определение 16

- в биологических средах 466
- в крови 569
- в слизистой 17
- с кислородной оксидоредуктазой 16
- ферментным термистором 463
- L-Лактата определение
 - анализатором YSI 265
- в крови для контроля за нагрузками спортсменов 264
- в цереброспинальной жидкости 265
- Лактата сенсор 12, 18
- L-Лактата сенсор на основе цитохрома с 220
- Лактатдегидрогеназа 208, 231, 276, 457
 - в сенсоре L-лактата 264
 - для диагностики 276
 - NAD-зависимая 208
 - определение активности в сыворотке 276
- Лактат-2-монооксигеназа 463, 466
 - в сенсоре L-лактата 264
- Лактатный электрод фирмы YSI 16
- Лактатоксидаза 276
 - в сенсоре L-лактата 264
- L-Лактатоксидаза 215, 216
 - иммобилизация 83
- Лактоза
 - определение 263, 462, 465
 - ферментным термистором 463
 - в контроле ферментационных процессов 463
 - сенсоры на основе β -галактозооксидазы и глюкозооксидазы 263
- Лангерганса островки 297, 572
- Ланжевена функция 365
- Лейкемия 548
- Лейкоциты
 - миграция 338
 - электрофоретическая подвижность 548
- Лекарственное отравление 571, 577
 - анализ на парацетамол и салицилат 571
 - скорость 571
 - фенobarбиталом 571
- Лекарственные препараты
 - как помехи определению 576
 - определение 57
- Лиазы 120
- Лизин 106
 - сенсор 25
- L-Лизин
 - биосенсор амперометрический 270
 - в проточной системе 270
 - определение 127
 - L-Лизиндекарбоксилаза, иммобилизация 83
 - Лизинмонооксигеназа 109
 - L-Лизиноксидаза, - иммобилизация 82
 - L-Лизин- α -оксидаза, из *Trichoderma viride* 270
- Лизосомы 542
- Лизоцим
 - иммобилизация 85
 - модификация лизиновых остатков 108
 - T4- 105
- Лимфоциты, электрофоретическая подвижность 548
- Липидов анализатор 272 сл.
- Липоамиддегидрогеназа 208, 215, 231
 - константа скорости реакций с ферроциний-ионом 207
- Липопротеинлипаза 273, 463, 466
- Лэнгмюра изотерма 513
- Лэнгмюра-Блоджетта пленки, из стеарата кадмия 415 сл.
- Люминесцентные сенсоры 474
- Люминол 495, 497, 500
 - каталитическое окисление в присутствии железа 501
- Люцифераза 489 сл., 497
 - бактериальная 491, 501
 - - клонирование 501
 - иммобилизация 82
 - иммобилизованная 491, 501
 - определение АТФ 490
 - светляка 489, 501
- Люциферин 489, 492, 498
 - накопление 492
- Макрофаги 578
- Максама и Гилберта метод секвенирования ДНК 94 сл.
 - реагенты 95
- Максвелла уравнения 521
- Максвелла-Вагнера релаксация 355
- Малата определение 491
 - при помощи люциферазы 491
- Малокровие, диагностика 276
- Мальтоза 276, 380
- Мандельштама-Брилюэна рассеяние
 - анализ биологических систем 542
 - исследование полимеров 547
- Манноза 380
- Маркуса теория 178
- Массоперенос, константы скорости 151
- МДПНТ см. Полевые транзисторы
- Медиаторы 149, 153, 180, 192, 226, 239
 - выбор 203
 - десорбция 218
 - долговременная устойчивость 244
 - кислород-независимые 252
 - критерии 213
 - липофильность 243
 - несамоокисляющиеся 234
 - определение понятия 213
 - редокс- 250
 - - "заякоренные" 250
 - скорость восстановления 243
 - схема действия 142
 - требования к, для биотопливных элементов 244
- Медуза *Aequorea*, биолюминесценция 489, 492 сл.
 - накопление люциферина 492
- Мезоксалонитрит *n*-оксиадецилокси-*m*-хлорфенилгидразина 297
- Мелдоловый голубой 141
- Мелибиоза 263
- Мембранный транспорт 100
- Мембраны
 - ацетилцеллюлозные 16
 - для ИСПТ 403
 - из ПВХ 118
 - поликарбонатные 16
- Метан
 - непрерывный мониторинг 586
 - определение "на линии" 28
 - сенсор 25
 - - на основе метанотрофных бактерий 97
 - - на основе *Methylomonas flagellata* 28
- Метанмонооксигеназа 97
- Метанол
 - определение
 - в культурных средах 24
 - в малых концентрациях 231
 - ферментным термистором 467
 - сенсор на основе бактерий 25
- Метанолдегидрогеназа 97, 230 сл.

- N-Метилакридиний 221
 Метиламин, конденсатор IgМОП, чувствительность к 435
 Метилвиологен, адсорбция на платине 198
 N-Метилгидантоин 437
 Метиленовый голубой как медиатор 243
 O-Метилзоомочевина
 Метилпиридинимидат как модификатор 107
 Метилтриметиламиноферроцен, константа скорости реакции с восстановленной глюкозооксидазой 208
 4-Метилумбеллиферон 482
 N-Метилфеназиния катион 216, 218
 - как медиатор 149, 177, 222
 - соль с TCNQ 143, 154, 161, 163, 165, 170, 177
 Метнионин
 - как диагностический индикатор 127
 - определение 127
 L-Метнионин-лиаза 127
 Метотрексат 531
 Микробные сенсоры на основе
 - *Brevibacterium lactofermentum* 20
 - клеток *Pseudomonas fluorescens* 22
 - *Trichosporon brassicae* 25
 Микрокомпьютеры 555
 - Apple II 557
 Микроорганизмов иммобилизация 249
 - адсорбция 249
 - ковалентное связывание 250
 - удерживание с помощью геля 249
 Миокардиальная ишемия 296
 Миокардита диагностика 277
 Митохондриальный биосенсор 35, 53
 Митохондрии 250
 - печени крысы 221
 Михаэлиса константа 100, 107, 143, 157, 160, 331
 - для окисления глюкозы, кажущаяся 233
 - кажущаяся 112
 Михаэлиса-Ментен закон 143
 Михаэлиса-Ментен кинетика 248
 Михаэлиса-Ментен модель 157
 Мицеллы, изучение структуры методами светорассеяния 548
 МНОППТ см. Полевые транзисторы
 Модификации электродов способы 174
 - классификация 175
 Модифицированные электроды 174
 - адсорбированные редокс-полимеры 216
 - анализ формы вольтамперограмм 184
 - в ионных затворах 180
 - в микроэлектронных устройствах 180
 - для вывода допамина 181
 - для контроля вывода лекарств 180
 - математическое описание реакций 177
 - определение механизма реакции 194
 - теоретические модели 174
 Молекулярный кислород как физиологический акцептор электронов 213
 Моллюск пресноводный *Latia neritoides* 493
 - люциферин из 493
 Моллюск-камнеточец *Pholas dactylus* 489
 - пероксидная система из 494
 Молочнокислый ацидоз 570
 Моноаминоксидаза 109
 Моносахаридов определение амперометрическими сенсорами 258
 МОППТ см. Полевые транзисторы
 Морские организмы биолюминесцирующие 488
 Морское перо *Renilla*, биолюминесценция 489, 492 сл.
 Морфина определение 60
 - флуоресцентное, предел обнаружения 531
 Мочевая кислота 78, 209
 - анализатор 267
 - помехи определению глюкозы 259
 - определение
 - - амперометрическими сенсорами 258
 - - в сыворотке 575
 - содержание в крови больных людей 576
 Мочевина 326, 378
 - диагностические тесты на 571
 - конденсатор IgМОП, отклик на 437
 - микробиосенсор 375
 - мольные энthalпии реакций, катализируемых ферментами 457
 - ферментный электрод 122, 125
 - на основе нонактина 125
 - электрод, чувствительный к, с химически связанной уреазой 120
 - сенсор на основе 126
 - - бобов канавалии мечевидной 35, 49
 - - IgМОППТ 438
 - ФПТ, чувствительный к 408, 411
 Мочевины определение
 - амперометрическими методами 266
 - аммонийселективным электродом 125
 - в крови 266
 - в крови или подкожной ткани 569
 - в крови и моче 375
 - в моче 569
 - в проточной аналитической системе 435
 - в сыворотке крови 464
 - для диагностики гематологических заболеваний 267
 - для оценки функции почек 266, 375, 570
 - микробиосенсором 375
 - потенциометрическим ферментным электродом 120
 - с иммобилизованной уреазой 464
 - ферментным термистором 463
 - ферментным электродом 116
 Мочи анализ
 - клинический 577
 - на наличие бактерий 542
 - с амперометрическим мочевинным электродом 266
 Муковисцидоз 66
 - диагностика с помощью ДНК-зондов 73
 Мультиплексер 550
 Мультиферментные системы, иммобилизация в колонке термистора 470
 Муравьиной кислоты сенсор 25
 - на основе *Citrobacter freundii* 26
 Мутагенез
 - заряженных поверхностных групп 105
 - с использованием олигонуклеотидов 102, 113
 - химический 102
 Мутаротаза 263
 Мышечная дистрофия Дюшене 72
 - диагностика с помощью ДНК-зондов 73
 Мышц заболевания, диагностика 267
 Найлон 327, 332
 Напряжения, соответствующие плоским энергетическим зонам 390
 Нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) метод 519, 522
 - принцип метода 522
 Нарушенного полного внутреннего отражения с флуоресценцией (НПВОФ) метод 519, 522
 - принцип метода 522

- туннелирование флуоресцентного света 522
- Натрий
 - диагностические тесты на 571
 - определение в
 - - крови или подкожной ткани 569
 - - моче 569
- Нейронов исследование, патологическая активность 305
- Нернста уравнение 186, 204, 402
- Нернстовские окислительно-восстановительные реакции 205
- Неспецифическое связывание 61
- Нефарадеевский ток 204
- Нефелометрия 520, 541
 - лазерная 520, 547
- Ник-трансляция 68
- Никотиновой кислоты сенсор 25
- Нистатина сенсор 25
- Нитратов определение 120
 - ферментным электродом 123
- Нитратредуктаза 123
- Нитратселективный электрод 118 сл.
- Нитрид кремния 375, 379, 397, 403
- Нитритов определение 120
 - ферментным электродом 123
- Нитритредуктаза 123
- n*-Нитрофенилфосфат 480
- n*-Нитрофеноксид 481
- Нитрофицирующие бактерии 31
- Нозерн-блоттинг 94
- Нонактин, электрод на основе 119, 125
- Нуклеиновых кислот гибридизация 89
- Обратная транскриптаза 67, 91
- Объем продаж 581
- Овальбумин, антитела к 61
- Овальбуминовый электрод 61
- Оксалата определение с кислородной оксидоредуктазой 16
- Оксалатдекарбоксилаза 463
- Оксалатооксидаза 231, 463
 - иммобилизация 83
 - константа скорости реакций с ферроциний-ионом 207
- Оксальцетатдекарбоксилаза 277
- Оксид алюминия как адсорбент 84
- Оксида углерода
 - непрерывный мониторинг 586
 - сенсор 209
 - на основе цитохрома с 220
- Оксидазы 203, 257
 - из *Pedococcus pseudomonas* 466
 - сенсоры, чувствительные к 485
 - субстраты
- СО-Оксидоредуктаза 208, 215, 232
 - бактериальная 221
 - константа скорости реакции с
 - - ферроциний-ионом 207
 - - цитохромом с 209
- Оксидоредуктазы 212, 215, 219, 231
- Оксилюциферин 489, 492
- Оксиметр волоконно-оптический 292, 296
- Олигонуклеотидный мутагенез 102, 113
- Олигонуклеотидных праймеров синтез 103
- Олигонуклеотиды 102
- Олигосахаридов определение амперометрическими сенсорами 257
- Омическое сопротивление системы, математическое выражение 346
- Оптические волокна 473, 476, 550
 - базовая конструкция 505
 - в качестве ЭВО 523
- из плавленного кварца 482
- пластиковые 482, 484
- стеклянные 483
- числовая апертура 506
- Оптические детекторы 11
- Оптические сенсоры
 - биохимическое определение pH и кислорода 476
 - кислородные 484
 - конфигурация 476
 - термин 473
 - стоимость и характеристики 476
- Оптод 473
- Оптрод 473
- Органеллы, иммобилизация в колонке термистора 470
- Органические кислоты
 - в крови тяжелобольных людей 576
 - определение амперометрическими сенсорами 258
- Орнитинтранскарбамиллаза 73
- Оросомукоид из сывотки крови 59
- Остановленного потока метод 207
- Очистка фермента 125
- Панкреатит, диагностика 276
- Панкреатические рибонуклеазы 109
- Папаин, иммобилизация 85
- Паракват 571
- Парацетамол
 - диагностические тесты на 571
 - лекарственное отравление 571, 577
 - определение в крови 575
- ПВХ-мембрана 118
- Пенициллин
 - мольные энтальпии реакций, катализируемых ферментами 457
 - определение 120
 - - в бродильных средах 128, 469
 - - в контроле процессов ферментации 463
 - - в производстве антибиотиков 469
 - - ферментным термистором 467
 - - ферментным электродом 116, 123
 - - сенсор на основе ИСПТ 375
 - - ферментный электрод 123
 - - ФПТ, чувствительный к 408, 411
 - - временная характеристика отклика 410
- Пенициллиназа 123, 128, 457, 463
 - иммобилизованная 469
- Пептидогликан 251
- Передаточная функция системы 363 сл.
- Переменноточковая вольтамперометрия 181
- Перилендибутират 484
 - в оптическом кислородном сенсоре 484
- Периплазматические ферменты 250
- Пероксид водорода 15
 - мольные энтальпии реакций, катализируемых ферментами 457
 - определение 500
 - - ферментным термистором 463
 - - сенсор
 - - амперометрический 47
 - - на основе ткани печени быка 35, 47
 - - на основе цитохрома с 220
- Пероксидаза 226, 262, 497
 - иммобилизованная 500
 - хрена 63, 73, 75, 267, 270, 497, 586
 - - сопряжение с электродами из NMP^+TCNQ^- 221
- Перхлоратный электрод 119
- Пестицидов определение 470
- Пиперидин, для секвенирования ДНК 95

- Пиренмасляная кислота 484
 Пиридинальдегида тиосемикарбазон, для модификации электродов 220
 Пирогаллол 63
 Пироэлектрики 441
 Пируват 215
 - мольные энтальпии реакций, катализируемых ферментами 457
 - определение с кислородной оксидоредуктазой 16
 - сенсор
 - - аналитические характеристики 49
 - - на основе кукурузного зерна 35, 48
 Пируватдекарбоксилаза 48
 Пируватоксидаза 215, 231, 276 сл.
 - константа скорости реакций с ферроциний-ионом 207
 Плазменного травления метод 308
 Плазма 92
 Плазмидные зонды 67
 Пластоцианин 108, 142, 220
 Пневмография 358
 Поверхностные плазмоны 523
 Поверхностный плазмонный резонанс
 - детектирование 527
 - оптические компоненты систем 527
 - принцип метода 522
 Поверхностный потенциал диэлектрика затвора 376
 Поджелудочная железа
 - бета-клетки 316
 - выработка инсулина 297
 Полевые транзисторы
 - газочувствительные 418
 - иммунохимически чувствительные (ИМПТ) 412
 - ионоселективные (ИСПТ) 375, 384
 - с диэлектрическим затвором 384, 389, 391 сл.
 - со структурой
 - - МДП 384, 387
 - - МНОП 384
 - - МОП 384, 425, 428
 - с рН-чувствительной мембраной 410
 - ферментные (ФПТ) 376
 - химически чувствительные (ХЧПТ) 384, 394, 415
 Поли (N-винилкарбазол) 251
 Полиакриламидный гель 249
 Полиакролеин, графт-полимеризация 81
 Поливинилбутираль 376
 Поливинилиденфторид как пьезоэлектрик 443
 Поливинилферроцен, константа скорости реакции с восстановленной глюкозооксидазой 208
 Поликарбонатные мембраны 16
 Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов 72
 Полинуклеотидкиназа 69
 Полипропилен 327, 332
 Полиуретан 327, 332
 Полупроводники
 - инверсия 389
 - n-типа 385
 - - инверсионный слой 389, 391
 - - сток и исток 397
 - p-типа 386, 397
 - уровень Ферми 386 сл.
 Полярографические детекторы 11
 Полярографический ферментный электрод 12
 Пороговое напряжение 389
 Постоянная времени см. Время релаксации
- Постоянная ячейки 352
 Пота клинический анализ 577
 Потенциометрические детекторы 11
 Потенциометрический ионофорный модуляционный иммуноанализ 62
 Почечное заболевание, диагностика 267
 Почечная функция 570
 - оценка микробиосенсором 375
 Почечной недостаточности диагностика 270
 Призма Кречмана 523
 Проводимость 351
 Проводящие органические соли, электроды на основе 154, 160, 165, 170, 177
 Проводящие полимеры для ионных затворов 181
 Прогестерон 498
 Пролин 104
 - -39 105
 Промоторы 220
 Промышленных отходов контроль 586
 Проницаемость раствора 141
 Пропанола определение, ферментным термистором 467
 Протопласты из *Paracoccus denitrificans* 221
 Проточно-инжекционный анализ 60
 Проточной цитометрии метод 542
 Проточный амперометрический детектор, в жидкостной хроматографии 145
 Пуллулан, определение 274
 Пуллулаза 277
 Пурины 141
 Пьезоконстанта 445
 Пьезоэлектрики 441
 - деформация 445
 - диэлектрическая постоянная 445
 - искусственные керамические 441, 449
 - относительная податливость 445
 Пьезоэлектрические преобразователи 452
 - технология 441
- Работа выхода электронов 387
 Радиоиммуноанализ 57, 497, 547
 - рынок сбыта методов 582 сл.
 Рассеяние света
 - бактериями 542
 - клетками и субклеточными частицами 542
 Раффиноза 17, 263
 Рачки *Cypridina hilgendorffii* 488, 493
 - механизм генерации света 493
 Реактивная проводимость 346
 Реактивное сопротивление электрохимической ячейки 351
 Редокс-кофактор 212
 Редокс-красители 218
 - как медиаторы 213
 Редокс-медиаторы 174, 241
 - "заякоренные" 250
 Редокс-ферменты 180
 Редокс-электроды 132
 - биокатализ на поверхностях 133
 - на основе глюкозооксидазы 132
 - очистка поверхности 132
 - правильность и воспроизводимость результатов 132
 Редуктаза, иммобилизация 491
 Резаурин 241
 Рекомбинантные ДНК 102
 Релея критерий 452
 Рестриктазы 68
 Ретикулоциты как источник мРНК 67
 Ретинопатия 292
 Ретролентальная фиброплазия 290

- Рибонуклеаза 85
 - модификация лизиновых остатков 108
 Рибонуклеаза А, изучение методами свето-
 рассеяния 547
 Рибофлавин 325
 РНК-азы 109
 РНК определение 120
 Родамин 511, 531
 Родаминаза 470
 Рождественская болезнь, диагностика с
 помощью ДНК-зондов 73
 Ртутный капаящий электрод 12, 144
 Рутения пентамминный комплекс, для
 модификации электродов 185
 Рынки сбыта биосенсоров 580
- С вращающимся диском с кольцом электрод
 223
 С диэлектрическим затвором полевые
 транзисторы 384, 389, 391 сл.
 - инверсионный слой 391 сл.
 - исток 391
 - канальная область 391 сл.
 - область объемного заряда 391 сл.
 - "сильная инверсия" 389, 392
 - сток 391
 СВО-сенсор 519
 - волоконно-оптический, одноразового
 пользования 534
 - для иммуноанализа 528
 - иммуобилизация антигенов 528
 - с БСА 528
 Салицилат
 - диагностические тесты на 571
 - определение при лекарственном отравлении
 571
 Саркозиноксидаза 126, 267
 - константа скорости реакций с ферроциний-
 ионом 207
- Сахара
 - непрерывное определение в потоке 469
 - ферментным термистором 469
 - усваиваемые, определение в бродильных
 средах 20
 Сахароза 263
 - гидролиз 262
 - определение 465
 - в контроле процессов ферментации 463
 - в присутствии глюкозы 263
 - в соке сахарной свеклы и какао 264
 - с микробным сенсором 21
 - ферментным термистором 463
 - феррицианидным методом 20
 Светляка биолюминесценция 488 сл., 494
 Световоды 519
 Светящиеся бактерии, биолюминесценция 489
 сл.
 - *Photobacterium phosphoreum* 491
 - *Vibrio harveyi* 491
 Сдвиговая жесткость 449
 Северинхауза CO₂-электрод 483
 Сердечные заболевания, диагностика 276
 Сердечные клапаны 578
 Серебра роданид, в ИСЭ 119
 Серебра сульфид, в ИСЭ 119
 Серин 104 сл.
 Сероводород
 - сенсор со структурой PdМОП 439
 - электрод, чувствительный к 120
 Серология, объем продаж реагентов 583
 Серповидная клеточная анемия 66, 71
 Сефароза 327
- Силикагель как адсорбент 84
 Синдром *Леши-Нихана*, диагностика с
 помощью ДНК-зондов 73
 Синусоидальные напряжения для исследования
 электродных процессов 344
 Система подачи инсулина
 - с открытым контуром 316
 - с замкнутым контуром 341
 Сифилиса возбудители, иммуноэлектрод на
 антитела к 416
 Сканирующей электронной микроскопии метод
 338
 Скорость ферментативной реакции 100
 Сложных эфиров определение амперометри-
 ческими сенсорами 257
 Слюны клинический анализ 577
 Спектр мощности флуктуации 363
 - перекрестный 363
 Спектроскопия комбинационного рассеяния
 542
 Спинномозговая жидкость, клинический
 анализ 577
 Спирты
 - определение 120
 - амперометрическими сенсорами 258
 - с кислородной оксидоредуктазой 16
 - сенсор 24, 209
 Сплайсинг 89
 Стабильность электрода 125
 Стафилококки, индифицирование фермента 286
 Стекло как адсорбент 84
 Стекланный электрод 116 сл.
 Стероидов анализ 497
 - гомогенный 498
Стокса-Эйнштейна уравнение 544
 Стрептавидин 75
 "Сцепления" эффект 104
 Струйный электрод 139
 Субтилизин 105
 Сульфоксидаза 492
 Сывороточный альбумин человека 61, 533
 - как антиген 533
Сэнгера метод секвенирования ДНК 94 сл.
- Табачной мозаики вирус, изучение методом
 ФКС 548
 Талассемия
 - α - 67
 - β - 66, 71
 - диагностика 71
 Твердотельной технологии методы 313
 Твердотельные электроды 117
 Твердые аноды 13
 Твердые катоды 13
 Твердые электроды, предварительная обработка
 144
 Температурный коэффициент отклика сенсора
 334
 Теофиллин
 - амперометрическое определение 59
 - тест на, объем продаж 583
 Термическая инактивация ферментов 101
 Термический ферментный датчик 458
 Термический ферментный иммуносорбентный
 анализ (ТФИСА) 464
 - автоматизированный 464
 Термоллизин, термическая устойчивость 109
 Тестостерона определение, при помощи
 липидфазы 491
 Тетраakis(алкиламиноэтилен) 481
 N,N,N',N'-Тетраметил-*n*-фенилендиамин как
 медиатор 227

- n*-(1,1,3,3-Тетраметилбутил)фенилфосфорная кислота, в калийселективной мембране для ИСПТ 403
- Тетраметилпроламин 219
- Тетрагидрофуран 218
- как медиатор для глюкозооксидазы 223
- соль с TCNQ 143, 161, 163, 166
- Тетраэтилоксииндметан 143, 154, 164, 177, 218
- Тефлон 327, 332
- Тиолактамаза 105
- Тиолы 141
- Тионин
- адсорбция на платине 198
- восстановление 243
- как медиатор 242, 264
- покрытие 190
- Тиреотропин, контроль за содержанием 575
- Тиروزил-гРНК-синтетаза 104 сл.
- Тиروزин 106, 497
- как диагностический индикатор 127
- определение 127
- сенсор на основе ткани сахарной свеклы 35, 51
- L-Тиروزин
- определение в биологических жидкостях 127
- ферментный электрод 122
- Тириноза 52
- L-Тиринозидеарбоксилаза 122, 127
- Тиротропин, хемиллюминесцентное определение 497
- Тобрамицин, тест на, объем продаж 583
- Ток заряджения двойного слоя 189
- Ток стока 399
- в металле 387, 389
- в полупроводнике 389
- Тонкопленочной технологии методы 313
- Топливный элемент 25
- биохимический 238
- микробный, принцип работы 241
- на основе *Methylomonas methylovosa* 246
- Треонин-51 104
- Триацилглицеринацилгидролаза 80
- Триглицериды 272
- определение 461, 465
- в крови 572
- ферментным термистором 463
- сывороточные, диагностика гиперлипидемии 272
- Тринитробензолсульфонат как модификатор 107, 110
- Трипсин 457
- ацетилирование 108
- иммобилизация 85
- на казеине 80
- сшивание 85
- Триптофан 508
- как диагностический индикатор 127
- Турбидиметрия 512, 541
- Тушение флуоресценции 479, 484, 508, 511, 513, 533
- галогенидное 485
- при связывании с белком 508
- сенсоры на основе 479
- кислородные 484
- Углового светорасеяния метод 542
- Угольный пастовый электрод 60
- Уксусная кислота
- определение 24
- сенсор 23, 25
- на основе *Trichosporon brassicae* 23
- Ультразвуковая абсорбционная спектроскопия 449
- Урат, мольные энтальпии реакций, катализируемых ферментами 457
- Уратоксидаза 267
- Уреаза 49, 122, 124 сл., 134, 376, 425, 426, 438, 437, 438, 457, 463, 464
- иммобилизованная 82, 464
- как ферментная метка 62
- редокс-электрод на основе 134
- Уриказы 267, 463
- иммобилизация 83
- Усваиваемые сахара 25
- Фактор VIII 73
- определение в плазме крови 275
- Фактор IX 73
- Фактор Коул-Коула 352
- Фарадеевский ток 204
- Фарадеевского процесса модель, для моно-слоино модифицированного электрода 186
- Феназинметосульфат 270
- как медиатор электронов 264
- Фенилаланин 106, 166
- как диагностический индикатор 127
- определение 127
- L-Фенилаланин, определение в крови 127
- Фенилаланин-164 105
- Фенилаланингидроксилаза 73
- Фениларсоновая кислота 531
- 7-Фенилацетил-ADCA 29
- Фенилкетонурия, диагностика с помощью ДНК-зондов 73
- Фенилфосфат 59
- Фенитоин 60
- определение 145
- тест на, объем продаж 583
- Фенобарбитал 571
- тест на, объем продаж 583
- Фенол 60
- Феноловый красный 482
- Ферментационных процессов контроль 463, 549, 580
- автоматический пробоотбор 282
- мониторинг роста биомассы 587
- при помощи микробных сенсоров 254
- Ферментная калориметрия 465
- Ферментные метки 58
- Ферментные микроэлектроды 17
- Ферментные полевые транзисторы (ФПТ) 376, 408
- формирование электрического отклика 408
- Ферментный реактор 257
- Ферментный термистор 458
- в клиническом анализе
- глюкозооксидаза/каталазный 465
- для контроля ферментационных процессов 462
- определение антигенов и антител 464
- с предколонкой 462
- схема 459
- Ферментный электрод полярографический 12
- Ферментов определение 57
- Ферменты, утилизующие кислород 282
- Ферми уровень полупроводника 386 сл.
- Ферредоксины 141
- из *Clostridium pasteurianum* 142
- Ферритин, тест на, объем продаж 583
- Феррицианид-ионы 16
- как медиаторы 213
- Ферроцен 208
- в электроде на основе глюкозооксидазы 215

- как медиатор 78, 214, 231, 301
- как метка 60
- константа скорости реакции с восстановленной глюкооксидазой 208
- Ферроцен/ферроциний как медиатор 149
- Ферроцена производные 325
- 1,1-Ферроцендикарбоновая кислота, константа скорости реакции с восстановленной глюкооксидазой 208
- Ферроцений-ионы как
 - медиаторы 206
 - переносчики электрона 215
- Ферроценмонокарбоновая кислота, константа скорости реакции с восстановленной глюкооксидазой 208
- Ферроцианид 16
 - калия, как медиатор 264
- Ферстера уравнение 498
- α -Фетопротеин, хемилюминесцентное определение 497
- Фибрин 338
- Фибробласты 338
- Физический захват фермента 121
- Фика законы
 - второй 188
 - первый 139, 192
- Флавин 141, 212
 - восстановленный 491
- Флавиномононуклеотид как медиатор электронов 264
- Флавиновая простетическая группа 166, 187, 212
 - пики окисления/восстановления 187
- Флавинодержащие оксидазы 222
- Флавопапаин 110
- Флавопротеиндегидрогеназы, модификация 109
- Флавопротеины 141, 161
 - исследование методом дифференциальной импульсной полярографии 187
 - кислород-неспецифичные 208
 - проводящие органические соли как электрокатализаторы 165
- Флавоцитохром b_2 208
 - константа скорости реакции с цитохромом c 209
 - ферроциний-ионом 207
- Флавоцитохром c дрожжевой 221
- Флуоресцеин 326, 476, 480, 483, 498, 509 сл.
 - как метка 515, 519, 531, 532
 - как pH-индикатор 483
 - производные 483
- Флуоресцентные сенсоры
 - кислородный 476
 - конфигурация 476
- Флуоресценция 494
 - деполаризации метод 512
 - квантовый выход 494
 - тушение 479, 484, 508, 511, 513, 533
 - галогенидное 485
 - при связывании с белком 508
- Флуориметрия с временным разрешением 510
- Флуорофоры 484, 510
- Формальдегида определение в малых концентрациях 231
- Фосфата определение
 - в крови и моче 270
 - в удобрениях и детергентах 270
 - для диагностики 270
 - сенсором на основе растительной ткани 271
- Фосфата сенсор на основе ткани картофеля 35, 50
 - анализ мочи и удобрений 271
- Фосфатидилхолин 273, 416
- 3'-Фосфоаденозин-5'-фосфосульфат 492
- 3',5'-Фосфоаденозинфосфат 492
- Фосфолипаза 273
- Фосфолипаза D 466
- Фосфолипиды 272
 - анализатор 273
 - определение 466
- Фотоакустическая спектроскопия 449
- Фотоакустический эффект 449
- Фотодиоды 500
- Фотолитографического маскирования метод 397, 406
- Фотонно-корреляционная спектроскопия 543 сл., 547
 - автокорреляционная функция сигнала 544
 - изучение вируса табачной мозаики 548
 - определение размеров и форм частиц 548
- Фоторезист 308, 406
- Фототаксис, одноклеточной водоросли 548
- Фраунгофера приближение дифракционного рассеяния 542
- Фруктоза 17, 380
 - определение 263
 - с кислородной оксидоредуктазой 16
 - с микробным сенсором 21
- β -Фруктофуранозидаза, иммобилизация 82
- Фталоцианин, для модификации электродов 197
- Фторида сенсор на основе ткани картофеля 35, 50
- Фторидный электрод 62
- Фторобратный электрод 119
- Фурье интеграл 361
- Фурье преобразование 361, 447
- Фурье-анализ 354
- Хемилюминесцентные сенсоры 481
 - на основе тетракис(алкиламиноэтилена) 481
- Хемилюминесценция 481
 - квантовый выход 494
 - метки 497
- Химическая модификация фермента 121
- Химические чувствительные полевые транзисторы (ХЧПТ) 384, 394, 415
 - адсорбция иодид-ионов 415
 - мембраны 415
 - одновременное определение K, Na, Ca и H^+ 426
 - поляризованные 415
- Химический мутагенез 102
- Химотрипсин 107
 - иммобилизация 81
 - модификация лизиновых остатков 108
 - модифицированный этилендиамином 108
 - сукцинилированный 107
- Хинолин, соль с TCNQ 143, 161, 163
- n -Хинон 262
- Хиноны 141, 212
 - как медиаторы 213
- Хинопротеинглюкозодегидрогеназа 79
- Хинопротеины 231, 235
- Хлоридный электрод 119
- Хлоропероксидаза
 - как ферментная метка 62
- Холестерин 272, 416
 - мольные энтальпии реакций, катализируемых ферментами 457

- определение 120, 272
- - в крови 572
- - с кислородной оксидоредуктазой 16
- - ферментным термистором 463
- ферментные электроды 272
- эфиры
- - определение 463
- - расщепление гидролазами 272
- Холестериноксидаза 272, 457, 463
- константа скорости реакций с ферроциний-ионом 207
- Холестеринэстераза 463
- Холиноксидаза 169, 273, 466
- константа скорости реакций с ферроциний-ионом 207
- Холинэстераза 470
- катализатор гидролиза ацетилхолина 461
- Хорея Хантингтона, диагностика с помощью ДНК-зондов 73
- Хорионический гонадотропин человека 59, 61
- биосенсор 59
- определение 59
- тест на, объем продаж 583
- Хэйнеса график 159, 161
- Целлюлозы определение 462, 465
- ферментным термистором, в контроле ферментационных процессов 463
- Целлюлоза 274
- как адсорбент 84
- Цефалоридин 29
- Цефалоспориин
- определение ферментным термистором, в контроле процессов ферментации 463
- сенсор на основе *Citrobacter freundii* 25, 29
- система для непрерывного определения 29
- Цефалоспориин С 29
- Цефалоспорииназа 29, 463
- Цефалотин 29
- Цианида определение 470
- Цианогенбромид 327
- Цианурхлорид 187, 218
- Циклическая вольтамперометрия 146, 181, 245, 381
- анализ формы вольтамперограмм для модифицированных электродов 184
- постояннотоковая 203
- - для выбора медиатора 203
- - для исследования реакций белков 208
- принцип метода 204
- Цистеин 104, 106
- сенсор на основе листьев огурца 35, 52
- -35 104 сл.
- -85 105
- L-Цистеиндисульфидгидролаза 52
- Цитоплазматические ферменты 250
- Цитохром *b₂* 277
- в сенсоре L-лактата 264
- сопряжение с электродами из NMP^+TCNQ^- 221
- Цитохром с 142
- из сердца лошади 194, 208, 220
- иммобилизованный, реакционная способность 112
- как медиатор 219
- реакция на модифицированном золотом электроде 198, 208
- электрохимия 219
- Цитохром *c₃* из *Desulfovibrio vulgaris* 142
- Цитохром *c_{55b}* 208, 221
- константа скорости реакции с цитохромом с 209
- Цитохром *cd₁* из *Pseudomonas aeruginosa* 221
- Цитохромоксидаза 208, 220
- Цитохромы 78, 141
- модификация лизиновых остатков 108
- Цифровой фильтр Баттерворта 564
- Частотный анализ сигналов 344
- Червь *Diplocardia* 489
- люцифераза из 493
- люциферин из 493
- Числовая апертура оптических волокон 506
- Ширина энергетической щели 385
- Шунтирование коронарной артерии 294
- Щавелевой кислоты определение
- в моче и сыворотке 466
- в пищевых продуктах 466
- калориметрическое 466
- ферментным термистором 463
- Щелочная фосфатаза 40, 59, 75, 270, 480
- иммобилизованная, сенсор на основе 480
- как ферментная метка 58
- - в иммуносенсорах 275
- Щитовидная железа
- анализ функции 497
- заболевания, диагностика 267
- Эквивалентная проводимость системы 346
- Экорин 501
- Эксудаты, клинический анализ 577
- Электрическое дихроизма метод 542
- Электроакустическое слияние клеток 451
- Электродные ансамбли многоцелевые 305
- интегральные схемы 306
- Электронного спинового резонанса метод 191
- Электронной спектроскопии для химического анализа (ЭСХА) метод 136
- Электрохимическая полимеризация 175
- Электрохимический детектор 257
- Электроэлюирование ДНК 68
- Элементы внутреннего отражения (ЭВО) 519
- кварцевые 528, 529
- - иммобилизация антител 529
- конструкция 525
- многократного отражения 519, 521, 525, 526, 534
- однократного отражения 519, 521, 525
- однократно отражающая призма 525
- оптические волокна 523, 527
- - иммобилизация антител 529
- - кварцевые 527
- оптический материал для 528
- покрытые антителами 529
- Эмбриональный канцерогенный антиген, тест на, объем продаж 583
- Эмфизема, диагностика с помощью ДНК-зондов 73
- Эндонуклеазы 89
- Энтальпиметрический анализатор проточный 458
- Энтальпиметрический метод с гексокиназой 464
- Энтеробактерии 432
- Эритроциты
- интактные 259
- лазерный контроль деформации 542
- отделение от плазмы крови 577
- электрофоретическая подвижность 548
- Эстриол 60
- Этанол 246
- анализатор 270
- определение

- - в биотехнологии 466
- - в крови 269
- - в культурных средах 24
- - в напитках 270
- - в пиве 269
- - для контроля качества пищевых продуктов 269
- - в ферментационных процессах 269, 463
- - ферментным термистором 463, 466
- сенсор 24 сл.
- - на основе *Trichosporon brassicae* 24
- Этанолдегидрогеназа 170
- Этиламин, конденсатор IgМОП, чувствительность к 435
- Этанолдегидрогеназа 170
- Этиламин, конденсатор IgМОП, чувствительность к 435
- Этилендиамин, конденсатор IgМОП, чувствительность к 435
- Этосульфат феназина как медиатор 230
- Эукариотические клетки 250

- AVEI см. 6-[N-(4-Аминобутил)-N-этил]амино-2,3-дигидро-1,4-фталазин-1,4-дион
- Acinetobacter calcoaceticus* 96
- Alcaligenes eutrophus*, микробный сенсор на основе 241
- AMP 489
- сAMP 498
- AMP-деаминаза 40
- Anabaena variabilis*, микробный сенсор на основе 241
- Arthrobacter simplex* клетки 80
- Aspergillus* клетки 80
- АТР 490
- H⁺-АТРаза 377
- термофильная 378

- В-клетки 572
- Bacillus* 94
- *subtilis Rec⁻* 25
- Brevibacterium lactofermentum* 20, 25

- Citrobacter freundii* 26
- Clostridium*
- *acetobutylicum* 432
- *butyricum* 238
- - микробный сенсор на основе 241

- Desulfovibrio vulgaris* 142

- Escherichia coli* 28, 68, 93
- клонирование в 97
- микробный сенсор на основе 241
- устойчивость к ампициллину 432
- хемотаксический отклик 548
- ML308, микробный сенсор на основе 241
- Erwinia carotovosa*, микробный сенсор на основе 241

- FAD 325
- определение амперометрическими сенсорами 258

- FITC-декстран 509, 515
- константа связывания с Con A 516
- FMN-оксидоредуктаза
- иммобилизация 82

- Hansenula anomala*, микробный сенсор на основе 241
- HTLV-III вирус (СПИД), антиген к 571

- Kluveromyces marxianus* клетки 80

- Lactobacillus*
- *arabinosis* 25
- *fermenti* 25
- - микробный сенсор на основе 241

- Methylomonas*
- *flagellata* 28
- *methylivosa* 241, 246
- - топливный элемент на основе 241, 246
- Methylosinus trichosporium*, экстракт из 230

- NAD(P), как редокс-кофактор 212
- NAD(P)⁺ 109
- NAD⁺/NADH 327
- как кофактор 154, 170
- NADH 110
- мольные энтальпии реакций, катализируемых ферментами 457
- определение при помощи люциферазы 491
- электрохимическое окисление 141
- NADH-дегидрогеназа 457
- NADP⁺/NADPH, медиатор 176
- Nocardia salmonicolor*, микробный сенсор на основе 241

- Paracoccus denitrificans* 221
- pH сенсор оптический 473, 475, 478
- аргоновый лазер как источник света 475
- интенсивность сигнала 475
- pH-электрод 116
- Photobacterium phosphoreum*, биолюминесценция 491
- Proteus vulgaris*, микробный сенсор на основе 241
- Pseudomonas* 93
- *aeruginosa* 221
- *fluorescens* 22
- *putida*, микробный сенсор на основе 241
- P. vulgaris* клетки 242
- сенсор на основе 246
- поглощение глюкозы 245

- Saccaromyces cerevisiae* 25
- Streptomyces* 94

- TCNQ см. Тетрацианохинодиметан
- Trichoderma viride* 270
- Trichosporon*
- *brassicae* 23
- - микробный сенсор 25
- *cutaneum* 30

- Vibrio harveyi*, биолюминесценция 491

Оглавление

Сведения об авторах	5
Предисловие	7
Предисловие к английскому изданию	9
БИОЛОГИЧЕСКИЕ КОМПОНЕНТЫ	11
Глава 1. Ферментный электрод. Лиланд С. Кларк-младший	11
Литература	18
Глава 2. Сенсоры на основе микроорганизмов. Исао Карубе	20
2.1. Введение	20
2.2. Сенсор для определения усваиваемых сахаров	20
2.3. Глюкозный сенсор	22
2.4. Сенсор уксусной кислоты	23
2.5. Сенсор спиртов	24
2.6. Сенсор муравьиной кислоты	25
2.7. Метановый сенсор	26
2.8. Сенсор глутаминовой кислоты	28
2.9. Цефалоспориновый сенсор	29
2.10. Сенсор БПК	30
2.11. Сенсор аммиака	31
2.12. Другие микробные сенсоры	32
Литература	32
Глава 3. Биосенсоры на основе растительных и животных тканей. Марк А. Ариольд, Гарри А. Рехштиц	34
3.1. Глутаминовый биосенсор	35
3.2. Аденозиновый биосенсор	39
3.3. Биосенсор АМР	43
3.4. Гуаниновый биосенсор	45
3.5. Биосенсор пероксида водорода	47
3.6. Биосенсор глутамината	48
3.7. Пируватный биосенсор	48
3.8. Биосенсор мочевины	49
3.9. Фосфат-фторидный сенсор	50
3.10. Допаминовый биосенсор	51
3.11. Тирозиновый биосенсор	51
3.12. Цистеиновый биосенсор	52
3.13. Митохондриальный биосенсор	53
3.14. Механизм отклика тканевого биосенсора	53
Литература	55
Глава 4. Новые подходы в электрохимическом иммуноанализе. Мотика Дж. Грин	57
4.1. Амперометрический иммуноанализ с использованием электрода Кларка	58
4.2. Амперометрический иммуноферментный анализ	59
4.3. Амперометрический иммуноанализ с использованием антигенов, меченных электроактивными частицами	60
4.4. Потенциометрический иммуноанализ	61
4.5. Иммуноанализ с использованием потенциометрических электродов	61
Литература	65

Глава 5. Диагностика генетических заболеваний человека. <i>Джон М. Оулд, Кей Е. Дэвис</i>	66
5.1. Введение	66
5.2. Методики определения генетических болезней	66
5.2.1. ДНК-зонды	66
5.2.2. Введение метки в зонды	68
5.2.3. Рестриктазный анализ	69
5.3. ДНК-зонды в диагностике генетических болезней	70
5.3.1. Обнаружение носителей генетических болезней	70
5.3.2. Пренатальная диагностика	73
5.4. Дальнейшие перспективы нерадиометрического детектирования	75
Литература	75
Глава 6. Имобилизация биологических компонентов в биосенсорах. <i>С. А. Баркер</i>	78
6.1. Специфические требования к методам иммобилизации в биосенсорах	78
6.2. Введение	79
6.3. Методы иммобилизации	80
6.3.1. Адсорбция	84
6.3.2. Захват	84
6.3.3. Сшивание	85
6.3.4. Образование ковалентных связей	86
Литература	87
Глава 7. Генная инженерия. <i>П. Дж. Уорнер</i>	89
7.1. Введение	89
7.2. Техника получения рекомбинантных ДНК	89
7.2.1. Молекулярное клонирование	89
7.2.2. Гибридизация нуклеиновых кислот	94
7.2.3. Определение нуклеотидной последовательности ДНК	94
7.2.4. Сайт-специфический мутагенез	95
7.3. Применение генной инженерии в сенсорной технологии	96
7.3.1. Увеличение выхода фермента	96
7.3.2. Улучшение свойств ферментов	97
7.3.3. Генетическое манипулирование целыми организмами, используемыми в сенсорах	97
7.4. Выводы	98
Литература	98
Глава 8. Белковая инженерия и ее возможные приложения в биосенсорах. <i>Энтони Э. Г. Касс, Эйда Кенни</i>	100
8.1. Введение	100
8.2. Модификация на уровне ДНК	102
8.3. Модификация полипептидной цепи	106
8.3.1. Модифицирование с целью повышения активности фермента	107
8.3.2. Модификация, вызывающая изменение поверхностных свойств	107
8.3.3. Модификация с изменением специфичности	109
8.3.4. Присоединение кофермента	110
8.3.5. Новые типы ферментативной активности	110
8.3.6. Частичный синтез белков	111
8.3.7. Модификация иммобилизацией	111
8.4. Заключение	113
Литература	113
БИОЭЛЕКТРОХИМИЯ. А. ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ	116
Глава 9. Иоиселективные электроды и биосенсоры на их основе. <i>С. С. Куан, Дж. Дж. Гилболт</i>	116
9.1. Введение	116

9.2.	Ионоселективные электроды	116
9.3.	Ферментные электроды	120
9.4.	Методика изготовления типичного электрода	121
9.4.1.	Аппаратура	121
9.5.	Рабочие характеристики электродов	122
9.6.	Примеры ферментных сенсоров на основе ионоселективных электродов	125
9.6.1.	Некоторые наиболее распространенные приложения ферментных электродов	125
9.7.	Производство ферментных датчиков	128
	Литература	128
Глава 10. Потенциометрические биосенсоры на основе редокс-электродов. Лемюэль Б. Уингард-младший, Джеймс Кастнер		131
10.1.	Введение	131
10.2.	Примеры биосенсоров на основе редокс-электродов	133
	Литература	137
Б. АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ		138
Глава 11. Принципы работы амперометрических сенсоров. Джордж С. Уилсон		138
11.1.	Введение	138
11.2.	Диффузия (массоперенос)	138
11.3.	Гетерогенный перенос электрона	141
11.4.	Теория формирования амперометрического сигнала ферментного электрода	143
11.5.	Электроды и их геометрия	144
	Литература	146
Глава 12. Амперометрические ферментные электроды: теория и эксперимент. У. Джон Элбери, Дерек Х. Крэстон		149
12.1.	Введение	149
12.2.	Модель ферментного электрода	150
12.3.	Уравнение стационарного состояния	151
12.4.	Электроды второго поколения	153
12.5.	NADH-электроды	154
12.6.	Отсутствие ингибирования фермента продуктом реакции	157
12.7.	Выбор между чувствительностью электрода и концентрационным диапазоном	159
12.8.	Электроды на основе проводящих органических солей	160
12.9.	Механизм электрохимической реакции	164
12.10.	Стабильность электрода	166
12.11.	Другие ферменты	166
12.12.	NADH-электроды	170
12.13.	Выводы	171
	Литература	172
Глава 13. Исследование модифицированных электродов электрохимическими методами. Н. П. Барлетт		174
13.1.	Введение	174
13.2.	Кинетика в системах с модифицированными электродами	177
13.3.	Электрохимические измерения в стационарном состоянии	182
13.3.1.	Циклическая вольтамперометрия	182
13.3.2.	Импульсная полярография	184
13.3.3.	Переменноточковая вольтамперометрия	188
13.3.4.	Ступенчатая хроноамперометрия	188
13.4.	Методы, основанные на вынужденной конвекции	191
13.4.1.	Вращающийся дисковый электрод	191
13.4.2.	Вращающийся дисковый электрод с кольцом	196
13.5.	Выводы	199
	Литература	199

Глава 14. Изучение ферментативных реакций, используемых в медиаторных биосенсорах, методом циклической вольтамперометрии. <i>Грэм Дэвис</i>	203
14.1. Введение	203
14.2. Постоянноточковая циклическая вольтамперометрия	204
14.3. Электрохимически сопряженные ферментативные реакции	205
14.4. Амперометрические биосенсоры	209
Литература	209
Глава 15. Перенос электрона от биологических молекул на электроды. <i>М. Ф. Кардонн, Э. Н. Ф. Тернер</i>	211
15.1. Введение	211
15.2. Медиаторы и химически модифицированные электроды	213
15.3. Ферментные электроды, основанные на регенерации кофактора	216
15.4. Амперометрические сенсоры на основе редокс-белков	219
15.5. Электроды из проводящих органических металлов, сопряженные с оксидазами	221
15.6. Заключение	223
Литература	223
Глава 16. Конструирование медиаторных амперометрических биосенсоров. <i>У. Дж. Астон</i>	226
16.1. Биотопливные элементы	227
16.2. Ячейки с задаваемым потенциалом	229
16.3. Конструкция медиаторных амперометрических датчиков	231
16.4. Плоские приборы	234
16.5. Производственные соображения	234
16.6. Заключение	235
Литература	236
Глава 17. Редокс-медиаторные электрохимические процессы с участием цельных микроорганизмов: от топливных элементов к биосенсорам. <i>Х. П. Бенетто, Дж. Бокс, Дж. М. Деланей, Дж. Р. Мейсон, С. Д. Роллер, Дж. Л. Стирлинг, К. Ф. Тэрстон</i>	238
17.1. Введение	238
17.1.1. Сенсоры с «прямым» и «косвенным» использованием микроорганизмов	238
17.1.2. Перенос электронов в ферментных и клеточных системах	239
17.2. Клетки как катализаторы в биосенсорах	239
17.3. Генерирование электрического тока микроорганизмами	241
17.3.1. Микробные топливные элементы	241
17.3.2. Взаимодействие медиаторов с микроорганизмами	243
17.3.3. Электрохимические аспекты	244
17.4. Экспериментальные устройства с цельными клетками	246
17.5. Перспективы развития микробных сенсоров	248
17.5.1. Общие соображения при конструировании микробных сенсоров	248
17.5.2. Конструирование биоактивных слоев	249
17.5.3. Имобилизация микроорганизмов	249
17.5.4. Редокс-медиаторные системы	250
17.5.5. Селективность, специфичность и помехи	252
17.6. Дальнейшие перспективы	253
Литература	254
Глава 18. Применение ферментных амперометрических биосенсоров в анализе реальных объектов. <i>Фридер В. Шеллер, Доротея Пфайфер, Флориан Шуберт, Рейнхард Решеберг, Дитер Киршштейн</i>	257
18.1. Введение	257
18.2. Применение амперометрических биосенсоров	258
18.2.1. Низкомолекулярные растворимые вещества	258
18.2.2. Низкомолекулярные поверхностно-активные вещества	271
18.2.3. Высокомолекулярные растворимые вещества	273
18.2.4. Активность ферментов	275
18.3. Заключение	278
Литература	278

Глава 19. Компенсированные ферментные электроды для контроля процессов in situ. <i>Свен-Олоф Эдфоре</i>	282
19.1. Введение	282
19.2. Кислород-стабилизированный глюкозный электрод	282
19.3. Принцип действия ферментного электрода с внешним буферированием	286
19.4. Компенсационные ферментные электроды для технологического контроля	287
Литература	288
Глава 20. Применение in vivo химических сенсоров и биосенсоров в клинической медицине. <i>Дензил Дж. Клермонт, Джон С. Пикап</i>	289
20.1. Введение	289
20.2. Газы крови	290
20.2.1. Мониторинг газов крови у недоношенных новорожденных детей	290
20.2.2. Мониторинг газов в крови пациентов с дыхательной недостаточностью	292
20.2.3. Мониторинг газов крови в ходе и после операции на сердце	294
20.3. Мониторинг калия	296
20.4. Концентрация ионов водорода	297
20.5. Глюкоза	297
20.6. Заключительные замечания	302
Литература	302
Глава 21. Тонкопленочные микроэлектроды для электрохимического анализа. <i>О. Прохазка</i>	305
21.1. Резюме	305
21.2. Введение	305
21.3. Миниатюрные тонкопленочные многоэлектродные датчики	306
21.3.1. Изготовление датчика	306
21.3.2. Электрические характеристики датчиков	308
21.3.3. Источники искажения сигнала и практические ограничения	311
21.4. Электроды камерного типа	312
21.5. Заключительные замечания	313
Литература	314
Глава 22. Проектирование и разработка глюкозных сенсоров для искусственной поджелудочной железы. <i>Гилберто Д. Велхо, Джерард Рич, Даниэль Р. Тевено</i>	316
22.1. Введение	316
22.2. Нужны ли на самом деле инсулиновые системы с замкнутым контуром?	318
22.3. Почему до сих пор отсутствует портативное устройство для введения инсулина с замкнутым контуром?	320
22.4. Электрохимические глюкозооксидазные сенсоры для искусственной поджелудочной железы. типы детекторов	322
22.4.1. Кислородные детекторы	322
22.4.2. pH-детекторы	323
22.4.3. Амперометрические детекторы пероксида водорода	323
22.4.4. Потенциометрическое детектирование пероксида водорода	324
22.4.5. Детекторы кофакторов	324
22.5. Конструкции глюкозооксидазных in vivo сенсоров	325
22.6. Глюкозные сенсоры: альтернативные подходы	326
22.7. Искусственная поджелудочная железа	327
22.8. Заключение	328
Литература	328
Глава 23. Игольчатые глюкозные сенсоры и их клиническое применение. <i>Мотояки Шичири, Рюзо Кавамори, Ёшимцу Ямасакэ</i>	331
23.1. Введение	331
23.2. Принцип определения глюкозы с помощью введенного в организм глюкозного сенсора	331
23.3. Изготовление глюкозного сенсора игольчатого типа	332
23.4. Характеристики глюкозного сенсора in vitro	333
23.4.1. Методика определения характеристик сенсора in vitro	333

	23.4.2. Дрейф и шум при измерениях	333
	23.4.3. Зависимость отклика сенсора от концентрации глюкозы	334
	23.4.4. Влияние температуры и давления кислорода	334
	23.4.5. Срок службы сенсора	334
23.5.	Характеристики глюкозного сенсора <i>in vivo</i>	334
	23.5.1. Методика определения характеристик сенсора <i>in vivo</i>	334
	23.5.2. Шумы при измерениях <i>in vivo</i>	335
	23.5.3. Отклик сенсора на уровень глюкозы в крови	335
	23.5.4. Отклик сенсора на изменение содержания глюкозы в крови	335
	23.5.5. Влияние давления кислорода при измерениях <i>in vivo</i>	335
	23.5.6. Срок службы сенсора в условиях <i>in vivo</i>	336
	23.5.7. Изучение поверхности сенсора с помощью сканирующего электронного микроскопа	338
23.6.	Мониторинг глюкозы <i>in vivo</i>	338
	23.6.1. Телеметрическая система мониторинга глюкозы	338
	23.6.2. Процедура телеметрического контроля глюкозы <i>in vivo</i>	340
	23.6.3. Непрерывный мониторинг глюкозы <i>in vivo</i>	340
23.7.	Применение системы контроля гликемии с замкнутым контуром	340
	23.7.1. Носимая искусственная поджелудочная железа	340
	23.7.2. Алгоритм управления замкнутой системой влияния инсулина и глюкагона	341
	23.7.3. Подавление шума	341
	23.7.4. Методика гликемического контроля в системе с замкнутым контуром с помощью носимой искусственной поджелудочной железы	341
	23.7.5. Замкнутая система контроля гликемии у больных диабетом	342
23.8.	Заключение	342
	Литература	343
В. ИЗУЧЕНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ИМПЕДАНСА		344
Глава 24. Принципы и возможности спектроскопии электрического адмиттанса. Дуглас Б. Келл		344
	24.1. Введение	344
	24.2. Электрический импеданс и адмиттанс	345
	24.3. Импедансные диаграммы	347
	24.4. Импедансные диаграммы в электрохимических системах	349
	24.5. Диэлектрическая проницаемость, удельная проводимость и дисперсия диэлектрической проницаемости	351
	24.6. Диэлектрическая спектроскопия биологических веществ	355
	24.7. Использование кондуктометрии и импедансометрии в биоанализе	357
	24.8. Импедансометрические системы	359
	24.9. Анализ спектров как неотъемлемый элемент биосенсорных измерений	361
	24.10. Использование кондуктометрических корреляционных функций для оценки двухфазных потоков в биореакторах	364
	24.11. Использование в биосенсорных устройствах многомерных диэлектрических спектров внутримолекулярных движений в белках	365
	Литература	367
Г. СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ КРЕМНИЕВЫХ ПОЛУПРОВОДНИКОВ*		375
Глава 25. Микробиосенсоры на основе кремниевых транзисторов. Исао Карубе		375
	25.1. Введение	375
	25.2. Сенсоры на основе полевых транзисторов	375
	25.2.1. Микросенсор для определения мочевины	375
	25.2.2. Микросенсор для определения АТФ	377
	25.3. Микроэлектродные сенсоры	379

* Главы 25–27 переведены канд. хим. наук А. А. Кирушкиным.

25.3.1.	Сенсор глюкозы на основе микроэлектрода, чувствительного к пероксиду водорода	379
25.3.2.	Сенсор глутамата на основе кислородного микроэлектрода	381
	Литература	382
Глава 26.	Химически чувствительные полевые транзисторы. Гэри Ф. Блэкбери	384
26.1.	Введение	384
26.2.	Теория химических сенсоров на основе полевых транзисторов	384
26.2.1.	Физика полупроводников	384
26.2.2.	Структура металл–диэлектрик–полупроводник	387
26.2.3.	Полевой транзистор с диэлектрическим затвором	390
26.2.4.	Химически чувствительный полевой транзистор	395
26.3.	Производство сенсоров	396
26.3.1.	Производство пластин	396
26.3.2.	Монтаж сенсоров	397
26.4.	Схемы управления и измерения	399
26.4.1.	Режим с постоянным напряжением затвора	399
26.4.2.	Режим с постоянным током стока	399
26.5.	Ионоселективный полевой транзистор	401
26.5.1.	Теория	401
26.5.2.	Ионоселективные мембраны для ИСПТ	402
26.5.3.	Временные характеристики	405
26.5.4.	ИСПТ с висящей сеткой	406
26.6.	Химически чувствительные полевые транзисторы на основе ферментов	408
26.6.1.	Теория	408
26.6.2.	Конструкции и характеристики ФПТ	409
26.7.	Иммунохимически чувствительные полевые транзисторы	411
26.7.1.	Теория	412
26.7.2.	Практические попытки разработки ИМПТ	415
26.8.	Газочувствительные полевые транзисторы	418
26.8.1.	Чувствительный к водороду ДЗПТ с палладиевым затвором	418
26.8.2.	ГПТ с висящим затвором	420
26.9.	Заключение	422
	Литература	423
Глава 27.	Биосенсоры на основе полупроводниковых газовых сенсоров. Бенгт Дашельссон, Фредрик Винквист	425
27.1.	Введение	425
27.2.	Физические основы	426
27.2.1.	Повышение чувствительности сенсоров к газообразному аммиаку	428
27.3.	Экспериментальные исследования	429
27.3.1.	Получение иммобилизованной гидрогеназы	431
27.4.	Результаты	431
27.4.1.	Определение газообразного водорода	431
27.4.2.	Аналитические системы на основе определения NH_3	434
27.5.	Заключение	437
	Литература	439
МЕХАНИЧЕСКИЙ И АКУСТИЧЕСКИЙ ИМПЕДАНС		441
Глава 28.	Принципы и возможности пьезоэлектрических преобразователей и акустических методов. Дэвид Дж. Кларк, Барри С. Блейк-Колеман, Майкл Р. Кэлдер	441
28.1.	Введение	441
28.2.	Пьезоэлектрические преобразователи	441
28.2.1.	Керамические материалы	442
28.2.2.	Полимеры	443
28.2.3.	Режимы преобразования	444
28.3.	Биосенсорные устройства с пьезоэлектрическими преобразователями	445
28.3.1.	Принцип действия электрогравиметрических сенсоров	445

	28.3.2. Гравиметрические биосенсоры	446
28.4.	Распространение акустических волн и акустический импеданс	448
	28.4.1. Основные принципы	448
	28.4.2. Приложения	449
28.5.	Акустическая микроскопия	451
28.6.	Акустическая резонансная денситометрия (АРД)	452
28.7.	Заключение и перспективы методов	454
	Литература	454
КАЛОРИМЕТРИЯ		457
Глава 29. Теория и практика калориметрических сенсоров. Бенет Даниельсон, Клаус Мосбах		457
29.1.	Введение	457
29.2.	Оборудование и методика эксперимента	458
	29.2.1. Аппаратура	458
	29.2.2. Колонка с ферментом	460
	29.2.3. Методика анализа	461
	29.2.4. Усиление теплового сигнала	461
29.3.	Практические приложения	462
	29.3.1. Термический ферментный иммуносорбентный анализ	464
	29.3.2. Применение в клинической медицине	464
	29.3.3. Определение активности фермента	467
	29.3.4. Калориметрический контроль в хроматографии	467
	29.3.5. Контроль технологических и ферментационных процессов	467
	29.3.6. Анализ объектов окружающей среды	470
29.4.	Заключение	470
	Литература	471
СПЕКТРОМЕТРИЯ		473
Глава 30. Оптические сенсоры на основе иммобилизованных реагентов. В. Рудольф Зейц		473
30.1.	Введение	473
	30.1.1. Диапазон проблем, обсуждаемых в этой главе	473
30.2.	Достоинства и ограничения волоконно-оптических сенсоров	474
30.3.	Технические вопросы	475
30.4.	Выбор реагента	478
	30.4.1. Индикатор	478
	30.4.2. Конкурентное связывание	479
	30.4.3. Катализатор	480
	30.4.4. Хемилюминесценция	481
	30.4.5. Адсорбент	481
30.5.	Применение оптических сенсоров на практике	482
	30.5.1. Определение pH	482
	30.5.2. Определение pCO_2	483
	30.5.3. Определение кислорода	484
	30.5.4. Сенсоры, чувствительные к ионам металлов	485
	30.5.5. Галогенидные сенсоры	485
	30.5.6. Другие сенсоры	486
	Литература	486
Глава 31. Перспективы применения био- и хемилюминесценции в биосенсорах. Ф. Мак-Канра		488
31.1.	Введение	488
31.2.	Биоломинесценция	488
	31.2.1. Биоломинесценция светляка	489
	31.2.2. Использование люциферазы светляка для определения АТФ	490
	31.2.3. Люминесценция бактерий	491
	31.2.4. Применение бактериальной люминесценции	491
	31.2.5. Другие биоломинесцентные системы	492

31.3.	Хемилюминесценция	494
31.3.1.	Механизмы хемилюминесценции	495
31.3.2.	Хемилюминесцентный иммуноанализ	497
31.3.3.	Методика измерения света	498
31.3.4.	Кинетические измерения	499
31.3.5.	Светоизмерительные приборы	499
31.4.	Возможные применения биосенсоров	500
	Литература	502
Глава 32. Конструирование волоконно-оптических биосенсоров на основе биорецепторов.		
	<i>Джером С. Шульц</i>	505
32.1.	Введение	505
32.2.	Оптические волокна	505
32.3.	Биосенсоры на основе биорецепторов	507
32.3.1.	Биосенсоры прямого действия	507
32.3.2.	Биосенсоры косвенного действия	508
32.4.	Математические модели аналитических характеристик биосенсоров	513
32.4.1.	Сенсоры прямого действия	513
32.4.2.	Сенсоры косвенного действия	513
32.4.3.	Сенсоры с многовалентным связыванием	516
32.5.	Заключение	516
	Литература	516
Глава 33. Спектроскопия внутреннего отражения в оптическом иммуноанализе. <i>Ранальд М. Сизерлэнд, Клаус Дене</i>		518
33.1.	Введение	518
33.2.	Теоретические аспекты	520
33.2.1.	Принципы спектроскопии внутреннего отражения	520
33.2.2.	Нарушенное полное внутреннее отражение и нарушенное полное внутреннее отражение с флуоресценцией	522
33.2.3.	Поверхностный плазмонный резонанс	523
33.2.4.	Эллипсометрия	525
33.3.	Практические соображения при выборе и использовании элементов внутреннего отражения	525
33.3.1.	Элементы внутреннего отражения	525
33.3.2.	Поверхностный плазмонный резонанс	527
33.3.3.	Требования к оптическим материалам	528
33.3.4.	Иммобилизация антител	528
33.4.	Применение СВО-приборов в иммуноанализе	530
33.4.1.	Нарушенное полное внутреннее отражение	530
33.4.2.	Нарушенное полное внутреннее отражение с флуоресценцией	531
33.4.3.	Поверхностный плазмонный резонанс	533
33.5.	Обсуждение	533
	Литература	535
Глава 34. Рассеяние лазерного света и связанные с ним методы. <i>Роберт Дж. Г. Карр., Роберт Г. У. Браун, Джон Г. Рэрти, Дэвид Дж. Кларк</i>		538
34.1.	Введение	538
34.2.	Основы теории рассеяния света	539
34.2.1.	Рэлеевское рассеяние	539
34.2.2.	Рассеяние Рэлея-Ганса-Дебая	540
34.2.3.	Рассеяние Ми	541
34.3.	Методы, основанные на рассеянии света	541
34.3.1.	Статические методы светорассеяния	541
34.3.2.	Динамические методы светорассеяния	543
34.4.	Применение динамических методов светорассеяния в биологии	547
34.5.	Перспективы методов светорассеяния	549
	Литература	550

ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОПРОЦЕССОРОВ	555
Глава 35. Использование микропроцессоров для повышения эффективности анализа при помощи ферментных сенсоров. Даниэль Тевено, Тьерри Теллагранд, Роберт Стериберг	555
35.1. Введение	555
35.2. Материалы и методика работы	555
35.2.1. Ферментные электроды	555
35.2.2. Программируемый настольный калькулятор для ферментного электрода	556
35.2.3. Микрокомпьютер для ферментного электрода	557
35.2.4. Отклик электродов	558
35.2.5. Оценка аналитических характеристик сенсоров	558
35.3. Автоматизация ферментных глюкозных электродов с помощью программируемого калькулятора	559
35.4. Использование микрокомпьютера для автоматизации ферментных глюкозных электродов	561
35.4.1. Разработка автоматизированного устройства для оценки параметров ферментного электрода	561
35.4.2. Оценка характеристик глюкозного электрода при помощи автоматизированного устройства	564
35.5. Выводы	566
Литература	567
КОММЕРЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ	568
Глава 36. Биосенсоры в медицине: клинические требования. П. Д. Хоум, К. Дж. М. М. Альберти	568
36.1. Возможности применения биосенсоров в медицине	569
36.1.1. Отделение интенсивной терапии	569
36.1.2. Пункты срочной и неотложной помощи и общетерапевтические палаты	570
36.1.3. Кабинет врача	571
36.1.4. Лечение сахарного диабета	572
36.2. Применение биосенсоров в медицине	574
36.2.1. Правильность, воспроизводимость и чувствительность	575
36.2.2. Время отклика	575
36.2.3. Градуировка	576
36.2.4. Мешающие вещества	576
36.2.5. Анализируемые пробы	577
36.2.6. Безопасность и надежность	577
Литература	578
Глава 37. Проблемы распространения и сбыта биосенсоров. Джеймс Маккан	580
37.1. Цикл жизни товара	580
37.2. Здоровоохранение	584
37.3. Ветеринария	586
37.4. Контроль ферментационных и других технологических процессов	586
37.5. Заключение	587
Предметный указатель	588

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу: 129820, И-110, ГСП, 1-й Рижский пер., д. 2, издательство «Мир».

Научное издание

Лиланд С. Кларк, Исао Карубе, Марк А. Арнольд и др.

БИОСЕНСОРЫ: ОСНОВЫ И ПРИЛОЖЕНИЯ

Заведующий редакцией О. А. Реутов
Зам. зав. редакцией Т. И. Почкаева
Научный редактор Е. А. Краснушкина
Мл. научные редакторы О. А. Половнева, И. С. Ермилова
Художник О. С. Василькова
Художественный редактор М. Н. Кузьмина
Технический редактор Т. А. Максимова
Корректоры А. Ф. Рыбальченко, Н. А. Гиря

ИБ № 7055

Сдано в набор 27.08.90. Подписано к печати 28.04.92.

Формат 70 × 100¹/₁₆. Бумага офсетная № 1. Печать офсетная.

Гарнитура гаймс. Объем 19,25 бум. л. Усл. печ. л. 50,05. Усл. кр.-отл. 100,10. Уч. изд. л. 57,08.

Изд. № 3/6608. Тираж 1000 экз. Зак. 1145. С102.

Издательство «Мир» Министерства печати и информации Российской Федерации
129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2

Можайский полиграфкомбинат Министерства печати и информации Российской Федерации
г. Можайск, ул. Мира, 93.