

## МИНИАТЮРНЫЕ ТОНКОПЛЕНОЧНЫЕ БИОСЕНСОРЫ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ К ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЕ И ГЛУТАМИНУ

<sup>1</sup>Г.В.Т.ТЮТРИНА, <sup>1</sup>А.В.ЖАРИКОВА, <sup>1</sup>В.А.ЗАНИН, <sup>1</sup>Т.Т.БЕРЕЗОВ, <sup>2</sup>И.МОЗЕР,  
<sup>2</sup>Г.ДЖОБСТ, <sup>2</sup>Е.АШАУЕР, <sup>2</sup>Р.СВАЗЕК, <sup>2</sup>М.ВАРАХРАМ, <sup>2</sup>Г.УРБАН

<sup>1</sup>Российский Университет Дружбы народов, медицинский факультет, Москва, 117198, Россия  
<sup>2</sup>Институт Общей электротехники и Электроники Технического Университета Вены 359/Е, Вена. 1040.  
Австрия

Сконструированы тонкопленочные биосенсоры для одновременного количественного определения в различных биологических жидкостях L-глутамина и L-глутаминовой кислоты в проточной микрокапеле. Оказалось возможным непосредственное определение концентрации глутамина в культуральных жидкостях по мере роста культуры с помощью нового биосенсора, приготовленного с использованием бактериальной глутамин(аспарагин)азы (КФ 3.5.1.38) (ГА) с оптимумом активности в области нейтральной рН среды. Совместная иммобилизация ГА и глутаматоксидазы внутри фотомоделированной гидрогелевой мембраны поли-(2-гидроксиэтилметакрилат) (pHE-МА) позволила приготовить биферментный сенсор для определения концентрации глутамина. Чувствительность датчика имеет линейную характеристику в пределах концентраций от 50 мкМ до 10 мМ глутамина/литр. Более того, биологический датчик, встроенный на чувствительную подложку, исключает влияние побочных примесей присутствующих в растворах. Чувствительные биосенсоры могут быть использованы по меньшей мере для 300 измерений без существенного снижения их точности. Предлагаемый новый датчик, совмещенный с проточной ячейкой, дает возможность одновременно измерять четыре различных параметра при объеме ячейки в 1 мкл. В дополнение к микросхеме были разработаны смонтированные на поверхности потенциометры, позволяющие получать результаты по типу "лаборатория в одной ячейке" ("Lab on chip").

**Ключевые слова:** полифункциональные миниатюрные биосенсоры, глутаминаза, глутаматоксидаза, тонкопленочная технология, микропроточная ячейка.

**Введение.** В ферментационной культуре клеток животных сахара с шестью атомами углерода, в частности, глюкоза, а из аминокислот - L-глутамин, являются главными источниками энергии. Глюкоза используется в концентрации от 2 до 20 мМ, а глутамин в пределах от 2 до 10 мМ. Некоторые типы культивируемых клеток при концентрации глутамина выше 2 мМ превращают его в глутаминовую кислоту и токсический для клетки аммиак [1]. Более того, растворенный глутамин с периодом полураспада 100 дней превращается в пирролидонкарбоновую кислоту и аммиак. Поэтому контроль концентрации глутамина при культивировании клеток необходим для поддержания и улучшения их жизнеспособности. Основным требованием для этой регуляции должна быть линейность масштаба быстрого измерения концентрации глутамина. Обычно для определения концентрации глутамина используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, который является дорогостоящим и длительным по времени [2].

В последнее время все чаще стали использоваться ферменты при конструировании биосенсоров, позволяющих количественно оценивать вещества, являющиеся субстратами для этих ферментов. Подобные биосенсоры применяются при определении концентрации отдельных химических компонентов в различных биологических жидкостях [3].

Амперометрические биосенсоры для глутамина это биферментные сенсоры с иммобилизованной глутаминазой и глутаматоксидазой. Ранее для конструирования такого биосенсора были использованы два различных фермента с глутаминазной активностью: Реннеберг и сотр. [4] и Каттанео и сотр. [5] для коиммобилизации применили глутаминазу из *Escherichia coli* (КФ 3.5.1.2), а Волленбергер и сотр. [6] - аспарагиназу (КФ 3.5.1.1) с 2%-ой глутаминазной активностью для этой же цели. Этот аспарагиназа/глутаматоксидазный сенсор должен был работать при pH 7,2; однако по времени он был активен только в течение двух дней. По ходу действия ферментов такого биосенсора происходило закисление реакционной среды, и поэтому для соблюдения всех условий проведения анализа и получения результатов измерения в области линейной зависимости необходимо было анализируемую смесь подавать в кювету измерений порциями и разбавлять ее в 13-15 раз. Все это требовало использования соответствующей дополнительной аппаратуры, например, такой как FIA [4] или YSI (Yellow Spring Instruments) клинический анализатор [5].

В данной работе представлено описание биосенсора для определения L-глутамина. В состав такого биосенсора входят два активных компонента - глутаматоксидаза и фермент с высокой глутамин(аспарагин)азной активностью (КФ 3.5.1.38). Применение вновь сконструированного биосенсора для количественного определения глутамина в биожидкостях, для которого была синтезирована мембрана с использованием фермента с высокой глутаминазной активностью в широком интервале pH среды, исключает предварительную обработку исследуемых образцов и применения комплекса дополнительного оборудования FIA, о котором указано выше. Присутствие глюкозы и молочной кислоты в исследуемой жидкости не мешает для непрерывного определения глутамина.

**Методика.** Используемые титан, платина и серебро были получены из лаборатории Balsers (Llechenstein). Irgacure 651 был любезно предоставлен Ciba Gelgy. Гидроксипропилметакрилат (HEMA) (>95%) и тетраметилэтиленгликольдиметакрилат (TESDMA) (75-85%) получены от Fluka, поли(2-гидроксипропилметакрилат) (pHEMA) из Polyscience, среда RPMI 160 из PAA, Linz. Все другие химические реактивы были чистые для анализа.

Глутаматоксидаза (КФ 1.4.3.11) из *Streptomyces* sp.X119-6 была любезно предоставлена компанией Yamasa Shoyu [7].

Глутамин(аспарагин)аза (КФ 3.5.1.3.3) из *Pseudomonas boreopolis* 526 выделена и очищена до гомогенного состояния Березовым и сотр. по методике Пехова и сотр. [8] с некоторыми новыми модификациями. Фермент имеет pH оптимум активности в нейтральной области, а соотношение глутаминазной и аспарагиназной активности как 1,5 : 1.

Все измерения проводили в 0,067 М фосфатном буфере, pH 7, при комнатной температуре и напряжении 0,5 V (vs Ag/AgCl). Анализируемый раствор пропускали через проточную кювету 30 секунд со скоростью 3 мл/мин.

В работе использовали обычный жидкостной электролитический анализатор для клиник (AVL, Graz) дополнительно оборудованный четырехканальными потенциометрами, подсоединенными к РС-базовым данным, и системой электропитания.

Принцип измерения основан на анодном окислении перекиси водорода, образующейся в реакции катализируемой глутаматоксидазой. Сенсорные чипы (ячейки) с четырьмя платиновыми электродами—(размером 1,8 x 0,44 мм<sup>2</sup>) и четыре-

мя рабочими электродами с поверхностью 1 мм<sup>2</sup> на стеклянном носителе были сконструированы ранее разработанным Урбаном и сотр. [9] методом тонкопленочной технологии. Электрополимеризованную мембрану использовали и как защиту для электрода [10]. В каждом случае были собраны на одном чипе два биферментных электрода для определения глутамина и два глутамат чувствительных электрода.

Глутаминовые и глутаматные биосенсоры сконструированы по тонкопленочной технологии в соответствии с методом ранее разработанным Урбаном и сотр. [9] для биосенсоров чувствительных глюкозе и молочной кислоте. Ферменты иммобилизовались путем включения в фотошаблон pHEMA гидрогелевой мембраны.

Стандартная гидрогелевая заготовка состояла из 28% pHEMA в качестве полимерной основы, 28% НЕМА как реактива мономера, 3% TEGDMA как поперечного сшивателя, 40% этиленгликоля как пластификатора и 1% Irgacure 651 как фотоинициатора. После смешивания всех этих компонентов прозрачный бесцветный раствор был профильтрован. Для изготовления нужной мембраны к вышеуказанной смеси добавляли соответствующий фермент. Эти образцы наносились на облицовку конструируемого электрода. После фотосшивания в течение 30 секунд неэкспонированная заготовка отмывалась. В процессе конструирования сначала готовилась мембрана, содержащая глутаматоксидазу для глутаматного сенсора, а затем формировали мембрану содержащую два фермента - глутаматоксидазу и глутаминазу чувствительную к глутамину. Обе эти мембраны, залитые светочувствительным гидрогелем, составляют интегрированный глутамат/глутаминовый электрод. Толщина ферментных мембран 8 мкм и покровных - 7 мкм. Сконструированные таким образом ферментные мембраны содержат соответственно в отдельности к каждому сенсору 0,04 единицы уд. акт./кв. мм глутаматоксидазы или 0,04 единицы уд. акт./кв. мм глутаматоксидазы и 0,04 единицы уд. акт./кв. мм глутаминазы.

**Результаты и обсуждение.** Глутаминаза катализирует гидролиз глутамина с образованием глутаминовой кислоты и аммиака (см. Схема 1). Образовавшаяся глутаминовая кислота под воздействием глутаматоксидазы окисляется до α-кетоглутаровой кислоты и в процессе поглощения кислорода образуется перекись водорода и аммиак (см. Схема 2). Перекись водорода реокисляется при 500 мВ и анализируется при помощи электрода Ag/AgCl.

На рис. 1 приведены данные четырех сенсорных ячеек, состоящих из двух глутаминовых и двух глутаматных электродов по отношению к раствору, содержащему 5 мМ глутамата и 2 мМ глутамина.

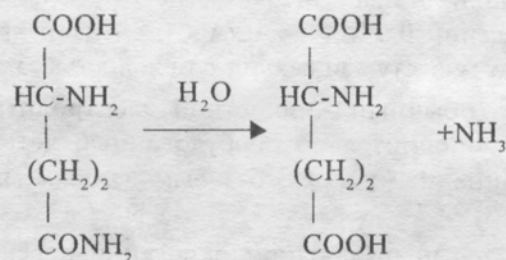


Схема 1.



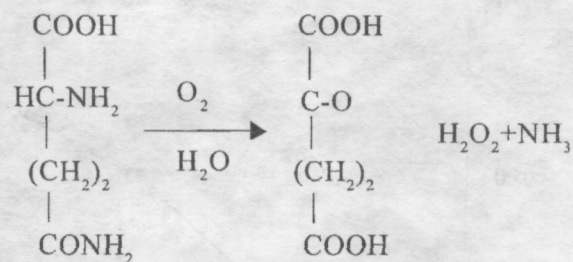


Схема 2.

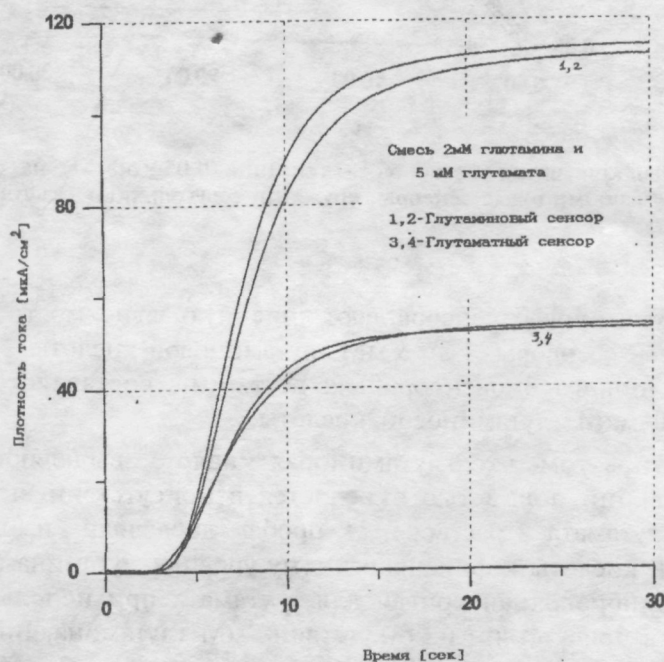


Рис. 1. Изменение скорости реакции от времени на сенсорных чипах по отношению к раствору 5мМ глутаминовой кислоты и 2мМ глутамина (1,2 - глутаминовые сенсоры; 3,4 - глутаматные сенсоры)

Оба типа сенсоров (как глутаматный, так и биферментный глутаминовый сенсор) работают со скоростью менее 15 секунд с 95%-ым выходом продуктов превращения субстрата.

Сконструированные биосенсоры работают с высокой избирательностью в широкой области линейной зависимости от концентрации субстрата. Это может быть объяснено свойством ограниченной диффузии для субстрата и высокой кислородной проводимостью мембран из р(НЕМА). При 40%-ой влажности величина кислородной проницаемости в р(НЕМА) составляет  $190 \times 10$  кв. см/сек (см. рт. ст.) [11]. Это значение в 140 раз больше, чем проницаемость кислорода в часто используемых поликарбонатных материалах [12]. На рис.2 представлена калибровочная кривая для определения L-глутамина (для глутаматного сенсора - плоская линия). На рис 3 на том же самом чипе дана кривая для определения L-



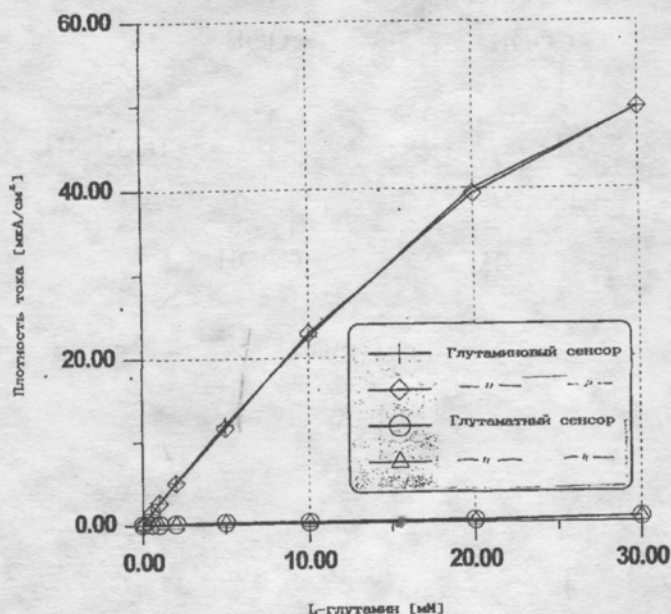


Рис.2. Калибровочная кривая для растворов L-глутамин (0,05 - 50мМ) на сенсорных чипах (кресты и квадраты - глутаминовые сенсоры; кружки и треугольники - глутаматные сенсоры).

глутамата. Оба глутаминовых сенсора дают линейную зависимость до 10 мМ глутамин, а глутаматные сенсоры - до 5 мМ глутаминовой кислоты. Предел чувствительности глутаминового биосенсора для глутамин составляет 50 мкМ, а для глутаматного - 100 мкМ глутаминовой кислоты.

Для уверенности в том, что глутаминовая кислота, выделяющаяся во время глутаминазной реакции полностью окисляется в присутствии высокой концентрации внешнего глутамата в растворе, к пробам добавляли избыточное количество глутаминской кислоты к фиксированному уровню глутамин (2 мМ). На рис. 4 представлена калибровочная кривая для глутамата при использовании биферментного сенсора в присутствии и отсутствии 2мМ глутамин. Видно, что наклон кривых не меняется как в присутствии, так и в отсутствии 2 мМ глутамин. Этот результат доказывает, что при помощи биферментного сенсора можно проводить измерения как глутамин в присутствии глутамата, так и определение глутамата моноферментным сенсором.

На рис. 5 представлены результаты изучения влияния рН среды образца на показания глутаминового сенсора (2 мМ). Концентрация всех используемых фосфатных буферов была 0,067 М. Максимальное положение - в области изоэлектрической точки глутамин (рН - 5,7).

Ранее Кюсакабе и сотр. [13] отмечали побочную активность глутаматоксидазы по отношению к аспарагину и аспарагиновой кислоте. Поэтому необходимо было проверить влияние указанных аминокислот на точность получаемых результатов анализа при работе с вновь сконструированным глутаминазным биосенсором. На рис.6 представлены кривые для глутаматного биосенсора, где в качестве субстратов использовали глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту или аспарагин. Для коррекции ошибок, получаемых при работе биосенсоров, могли бы быть введены различные поправки. Как видно из рисунка, влияние аспарагина или аспарагиновой кислоты на фон кривой для глутаминовой кислоты мало; тем бо-

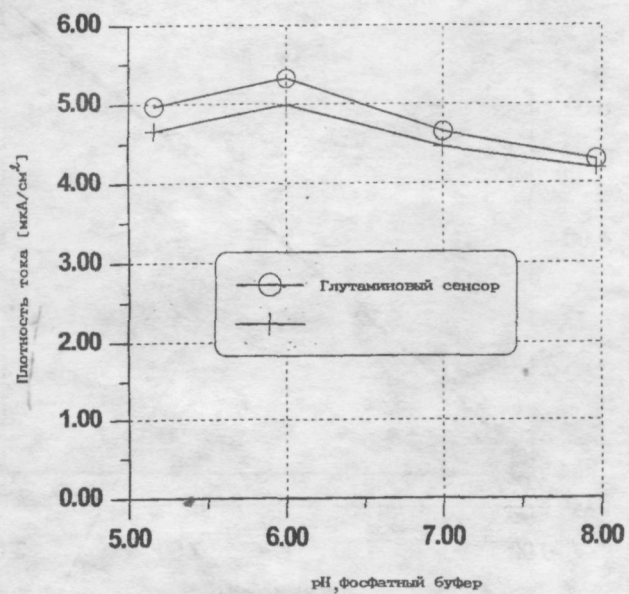


Рис.5. Влияние pH среды на катализ 2мМ глутамин в 0,067 М фосфатном буфере при работе глутаминовых сенсоров.

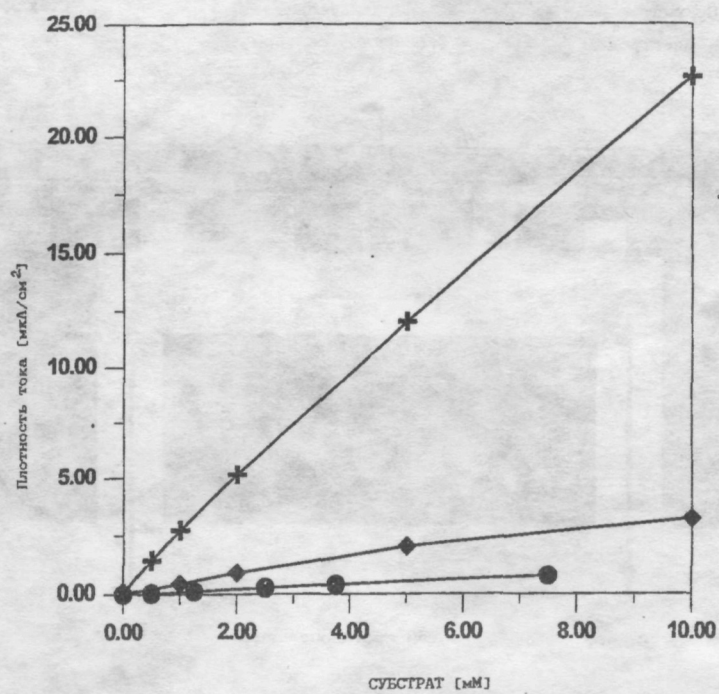


Рис.6. Калибровочные кривые на глутаматном сенсоре для глутаминовой кислоты (кресты), аспарагина (квадраты), аспарагиновой кислоты (кружки).

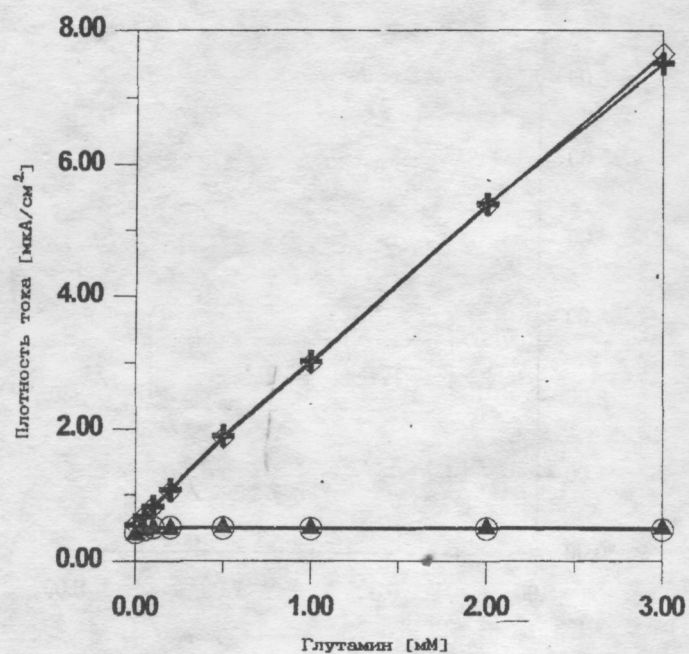


Рис.7. Калибровочные кривые для L-глутамина на глутаминовых (кресты и квадраты) и глутаматных (кружки и треугольники) сенсорах в присутствии среды RPMI 1640.

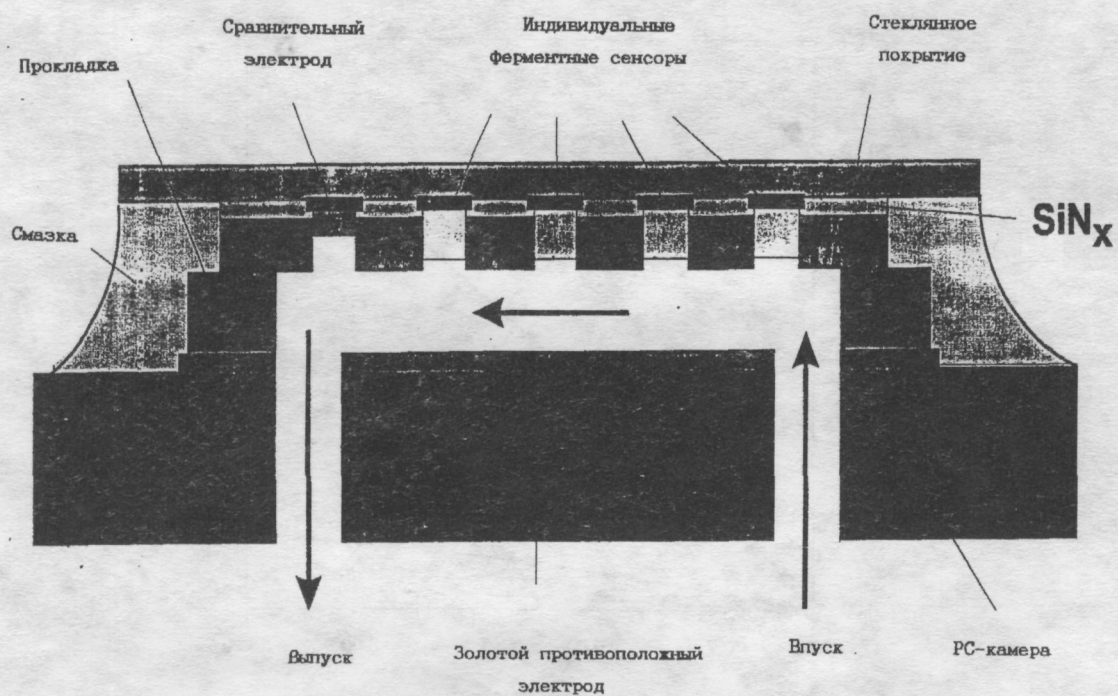


Рис.8. Профиль измерительной проточной микроячейки.



### Характеристика типа сконструированных биосенсоров

	Глутаминовый	Глутаматный
Предел чувствительности	50 мкМ	100 мкМ
Область линейной зависимости	до 10 мМ	до 5 мМ
Время реакции с 95%-ым выходом ее продуктов	< 15 сек.	< 15 сек.
Пределы воспроизводимости	2,8% r.s.d. (n=16)	3,0% r.s.d. (n=16)
Воспроизводимость день за днем	3,4% r.s.d. (n=6)	3,8% r.s.d. (n=4)
Воспроизводимость на чипе	4% r.s.d. (n=6)	1,9% r.s.d. (n=4)
Стабильность при хранении в сухом виде при 4°C	> 3 месяцев	> 3 месяцев
Операционная стабильность работы	> 300 измерений в течение трех недель	> 300 измерений в течение трех недель

лее при их низких концентрациях в общей пробе. Максимальная концентрация для аспарагина - 0,3 мМ и для аспарагиновой кислоты - 0,45 мМ. Использование среды RPMI 1640 не влияет на количественное определение глутамина. Величины ошибок из-за присутствия примесей в реакционной среде эквивалентны 0,3 мМ глутамина (рис.7) и могут быть исключены при расчетах.

Вновь сконструированные глутаминовые биосенсоры хорошо сохраняются в сухом виде при 4 градусах по Цельсию. Они были использованы для 300 измерений без каких-либо изменений в их характеристике и оставались стабильными при хранении при 4 градусах по Цельсию более трех месяцев.

Микропроточная ячейка - "лаборатория на чипе" - состоит из двух частей:

1. Верхняя часть (крышка) сделанная на основе применения тонкопленочной технологии; включает один Ag/AgCl сравнительный (эталонный) электрод и четыре платиновых рабочих электрода, которые могут быть индивидуально приготовлены и обернуты соответствующими ферментными мембранами, как это описано в разделе "ферментные мембраны". (pHEMA)-верхняя покрывающая мембрана защищает как ферментные, активные электроды, так и сравнительный (эталонный) электрод. Полимер покрывающий электрод обеспечивает большую его стабильность по сравнению с необлицованным электродом. Ag/AgCl как сравнительный электрод, должен быть наиболее стабильным в анализируемых биожидкостях [14].

2. Нижняя часть - штампованный круглый сосуд, снабженный золотыми противоположными электродами с изолирующим слоем толщиной в 100 мкм, и линией электрической системы.

Обе эти части, которые сконструированы по прописи хорошо изученных, обоснованных производственных технологий, являются легко объединяющимися частями (узлами) стандартного оборудования и способны выдавать данные по четырем параметрам исследуемого образца объемом менее 1 мкл (рис.8). Методы для одновременного линейного измерения глюкозы, молочной кислоты, глутамина и глутаминовой кислоты уже разработаны и их применение для мониторинга ферментов будет представлено в отдельной статье.

Характеристики сконструированных биосенсоров для определения глутамина и глутаминовой кислоты представлены в таблице вместе с некоторыми их статистическими данными. Описанный глутаминовый биосенсор обладает высокой

активностью в нейтральной области pH среды, что обусловлено свойствами используемой глутамин(аспарагин)азы, и может работать с глюкозным и лактатным биосенсорами в том же сенсорном "чипе".

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stephanopoulos G.*//In Biotechnology. 1993. V.3. Bioprocessing. Ed. H.-J. Rehm & G.Reed. VCH. Weinheim. P. 144-145.
2. *Larsen B.R., West F.G.*//J.Chromatogr.Sci. 1981. V.19. P.259-265.
3. *Березин И.В.*//Прикл. биохимия и микробиология. 1982.Т.XVI II.Вып.2.С.451-453.
4. *Renneberg R., Trott-Kriegskorte G., Lietz M., Jager V., Pawlova M., Kaiser G, Wollenberger U., Schubert P., Wanner R., Schmid R.D., Sheller P.W.*//J.Biotechnol. 1991. V.21. P. 173-186.
5. *Cattaneo M.V., Luong J.H.I., Mercille S.*//Biosensors Bioelectronics. 1992. V.7. P.329-334.
6. *Wollenberger U., Scheller P.W., Bohmer A., Passarge M., Muller H.G.*//Biosensors. 1989. V.4. P.331-391.
7. *Kusakabe H., Midrorikawa Y., Pujishima T., Kuninaka A., Yoshino H.*//Agric.Biol.Chem. 1983. V.47. P.1323-1328.
8. *Пехов А.А., Занин В.А., Магретова Н.Н. и др.*// Бюлл.эксп.биол.мед. 1985. Т.99. P.557-560.
9. *Urban G., Jobst G., Aschauer E., Tilado O., Svasek P., Varahram M., I Ritter C., Riegebauer J.*/Sensors & Actuators. 1994. B 18-19. P. 592-596.
10. *Gleise R., Adams J.M., Barone N.J., Yacynych A.M.*//Biosensors & Bioelectronics. 1991. V.6. P.151-160.
11. *Yasuda H., Gochin M., Stone W.*// J.Polymer. Sci. 1966. V.4. P.2913-2927.
12. *Paul D.R.*//Ber.Bunsenges.Phys.Chem. 1979. V.83. P.294-302.
13. *Kusakabe H., Midrorikawa Y., Pujishima I.*//Agric. Biol. Chem. 1984. V.48. P.181-184.
14. *Moussy F., Harrison D.J.*//Anal. Chem. 1994. V.66. P.674-679.

## MINIATURIZED THIN FILM GLUTAMATE AND GLUTAMINE BIOSENSORS

TYUTRINA G.V., ZHARIKOVA A.V., ZANINE V.A., BEREZOV T.T., MOZER I., JOBST G., ASCHAUER E., SVASEK P., VARAHRAM M., URBAN G.

Russian People's Friendship University, ul.Miklukho-Maklaya,8, Moscow,117198.Russia.  
Technical University of Vienna, Institut fur allgemeine Elektrotechnik und Elektronik 359/E,  
Gusshausstr.27, 1040 Vienna. Austria.

Integrated thin film biosensors for simultaneous measurement of L-glutamine and L-glutamate in a micro-flow cell were developed. Due to a novel glutaminase with an activity optimum in the neutral pH range a direct monitoring of glutamine in mammalian cell culture medium could be performed. The glutamine bienzyme sensor was prepared by coimmobilization of glutaminase with glutamate oxidase within a photopatterned poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA) hydrogel membrane. The sensor response is linear in the concentration range of 50 mmol to 10 mmol glutamine/l. Additionally a glutamate biosensor is integrated on the sensor chip for difference measurement of possible glutamate interferences. The sensorchip can be used for at least 300 measurements without any alteration in the performance of its sensors.A new sensorchip with an integrated flow cell provides the possibility of simultaneous measurement of four different parameters at a cell volumina of 1 ml. Completing the microsystem a battery operated surface mounted device (SMD) potentiostat was developed to get a "lab on chip".

**Key words:** integrated miniaturized biosensor, glutaminase, glutamate oxidase, thin film technology, integrated sensors, micro flow cell.