



УДК 577.352.2 + 577.152.113*4

© 1991 г.

С. Ю. Зайцев, Т. Ханке, У. Волленбергер*,
В. Эберт*, Н. А. Балабина, В. П. Зубов,
Ф. Шеллер**

МОНО- И МУЛЬТИСЛОЙНЫЕ МЕМБРАНЫ С АДсорБИРОВАННОЙ ГЛЮКОЗОоксиДАзой

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;

**Центральный институт молекулярной биологии АН ГДР, Берлин—Бух*

Получены и исследованы адсорбционные слои глюкозооксидазы на границе раздела вода — воздух. Показано, что фермент значительно сильнее сорбируется на положительно заряженных липидных монослоях, чем на цвиттер-ионных или отрицательно заряженных, что можно объяснить наличием общего отрицательного заряда на молекулах глюкозооксидазы при нейтральных рН. Измерено распределение активности фермента в различных частях лентгюрской ванны. Биосенсор, полученный путем переноса липид-белковых монослоев на Pt-электрод, позволяет определять глюкозу в области концентраций 0,5—5,0 мМ. Показано, что амперометрический сигнал биосенсора на глюкозу зависит от числа перенесенных липид-белковых монослоев и величины поверхностного давления, при котором осуществлялся данный перенос.

Перспективы использования метода Ленгюра — Блуджетт для создания биосенсоров широко обсуждаются в последнее время [1, 2]. Описаны отдельные мембранные системы на основе светочувствительных белков (бактериородопсина, белков реакционных центров фотосинтетических бактерий), моделирующие свойства фотодатчиков [3—5]. Однако наиболее продвинутые исследования по биосенсорам сконцентрированы в области создания ферментных электродов [4, 6]. В то же время получить стабильные монослои ферментов на границе раздела вода — воздух долгое время не удавалось (в отличие от мембранных белков) вследствие их высокой растворимости в водной субфазе и быстрой денатурации на поверхности. Недавно японские ученые сообщили о получении адсорбционных слоев ферментов на поверхности монослоев поверхностно-активных веществ для создания на их основе ферментных электродов [2, 7, 8]. Такой подход, по-видимому, универсален для получения биосенсоров методом Ленгюра — Блуджетт.

Цель настоящей работы — детальное исследование адсорбции глюкозооксидазы на монослои различных поверхностно-активных соединений для создания биосенсора на их основе.

Первоначально была исследована способность глюкозооксидазы сорбироваться на монослои различных поверхностно-активных соединений (ПАВ): стеариновой кислоты, природного липида фосфатидилхолина, цетилтриметиламмонийбромида и их смесей на границе раздела вода — воздух.

Как видно из рис. 1, площади, приходящиеся на молекулу ПАВ в монослое, после 1 ч адсорбции глюкозооксидазы из водной субфазы (1 мг белка в 1 л 1 мМ фосфатного буфера, рН 7,0) увеличиваются почти на 50% в случае стеариновой кислоты и более чем на 200% в случае ее смеси с СТАВ (1 : 1 моль/моль). Изотерма для системы стеариновая кислота — глюкозооксидаза (рис. 1, 2) имеет те же точки перехода из жидко-растянутого в конденсированное состояние и коллапса монослоя, как и изотерма для индивидуальной стеариновой кислоты (рис. 1, 1), что свиде-

Сокращения: СТАВ — цетилтриметиламмонийбромид, РС — фосфатидилхолин.

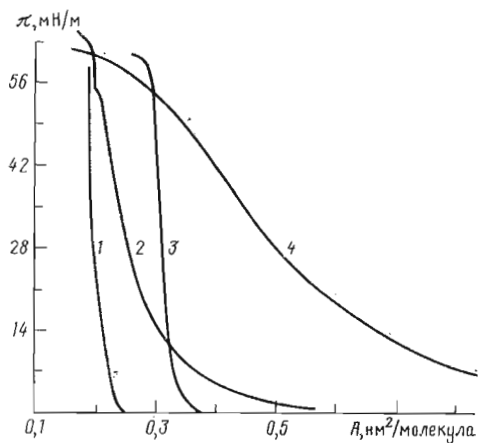


Рис. 1

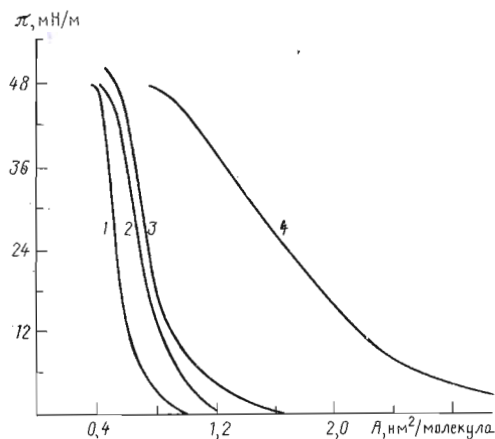


Рис. 2

Рис. 1. Изотермы для монослоев стеариновой кислоты и смеси стеариновой кислоты — СТАВ, 1 : 1 (моль/моль) до (1, 3) и после 1 ч адсорбции глюкозооксидазы (2, 4) (1 мМ фосфатный буфер, рН 7,0, при 20° С)

Рис. 2. Изотермы для монослоев фосфатидилхолина и РС — СТАВ, 1 : 1 (моль/моль), до (1, 3) и после 1 ч адсорбции глюкозооксидазы в 1 мМ фосфатном буфере при 20° С (2, 4)

тельствует о несмешиваемости белка и кислоты. Появление перегиба на изотерме стеариновая кислота — глюкозооксидаза при давлении 53,7 мН/м можно объяснить коллапсом адсорбированного белкового слоя. По-видимому, фермент незначительно сорбируется на внешней поверхности, не включаясь непосредственно в монослой стеариновой кислоты.

В случае адсорбции фермента на смешанных монослоях стеариновая кислота — СТАВ вид изотермы существенно изменяется. Система в присутствии фермента имеет только жидко-растянутое состояние (рис. 1, 4), тогда как исходный монослой стеариновая кислота — СТАВ имеет только конденсированное состояние (рис. 1, 3). Коллапс смешанного монослоя ПАВ наблюдается практически в точке (59,0 мН/м и 0,29 нм²/молекула), а в присутствии белка коллапс монослоя происходит при более низких давлениях (55,0—57,0 мН/м) и значительно «растянут», хотя и в той же области площадей (0,30—0,25 нм²/молекула). Наблюдаемые изменения свидетельствуют о наличии липид-белковых взаимодействий, что приводит к смешиваемости монослоя и даже частичному встраиванию белка в гидрофильную область липидного слоя.

К сожалению, не удается получать стабильные монослои из индивидуального СТАВ на границе раздела вода — воздух, что делает невозможным исследование адсорбции глюкозооксидазы на таких монослоях. Поэтому приходится использовать смеси СТАВ с другими ПАВ.

Изотермы, свидетельствующие об адсорбции глюкозооксидазы на монослои фосфатидилхолина и его смеси с СТАВ, приведены на рис. 2. Площадь на молекулу липида в присутствии фермента увеличивается на 34% в случае фосфатидилхолина (рис. 2, 1, 2) и почти в 3 раза для смеси РС — СТАВ (1 : 1 моль/моль; рис. 2, 3, 4). В то же время давление коллапса липид-белковых монослоев незначительно отличается от такового для исходных монослоев липидов. Однако площади, приходящиеся на молекулу липида, при которых наблюдается коллапс липид-белковых монослоев, значительно больше, особенно в присутствии СТАВ (рис. 2, 4). Таким образом, адсорбция глюкозооксидазы на положительно заряженном смешанном монослое РС — СТАВ значительно больше, чем на монослой цвиттер-ионного фосфатидилхолина, при этом в обоих случаях образуются стабильные липид-белковые пленки (рис. 2, 2, 4). По-видимому, при взаимодействии глюкозооксидазы с фосфатидилхолином определенную роль играет отталкивание отрицательно заряженных фосфатных групп молекулы липида и отрицательно заряженных участков

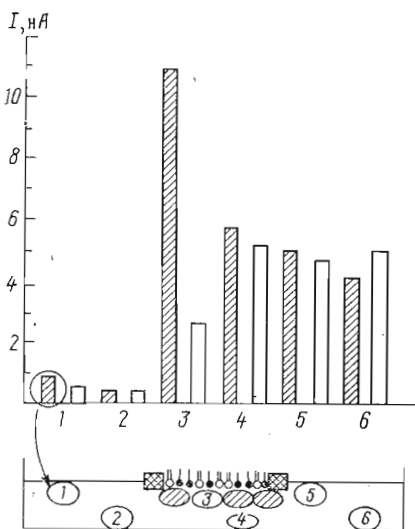


Рис. 3

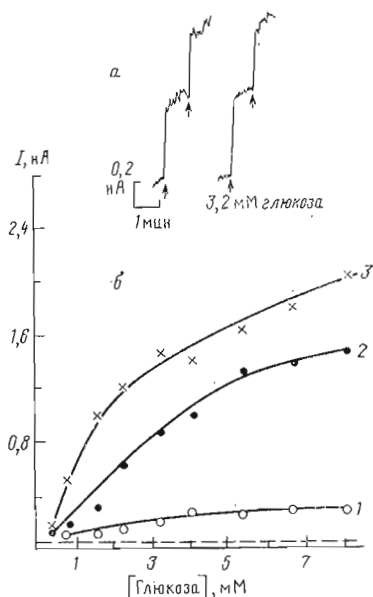


Рис. 5

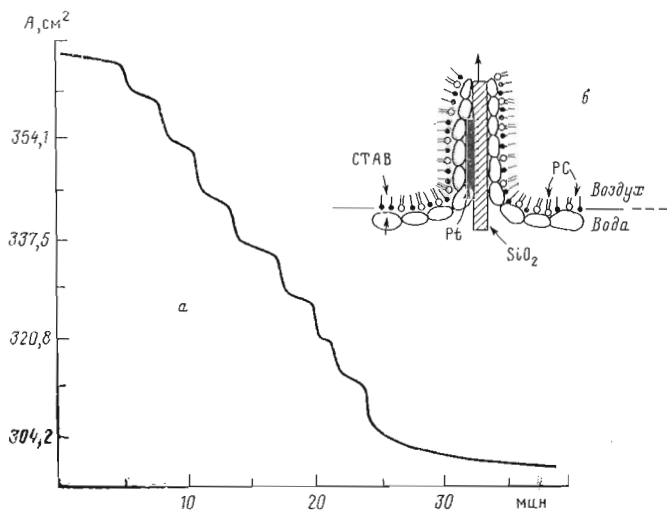


Рис. 4

Рис. 3. Зависимость тока от места отбора образцов в лэнгмюровской «ванне» для индивидуальной глюкозооксидазы (светлые столбцы) и фермента, адсорбированного на монослой РС—СТАВ (заштрихованные столбцы)

Рис. 4. Зависимость площади монослоя РС—СТАВ с адсорбированной глюкозооксидазой от времени при постоянном поверхностном давлении 30 мН/м и 20° С (а) и общая схема такого монослоя, переносимого методом Лэнгмюра — Блоджетт с водной субфазы на поверхность Pt-электрода для создания биосенсора (б)

Рис. 5. Амперометрические сигналы биосенсора на глюкозу: а — амперометрический сигнал биосенсора, покрытого липид-белковой бислойной пленкой, на добавление 3,2 мМ глюкозы (стрелка) в измерительную ячейку с 10 мМ фосфатным буфером (рН 7,2) при 20° С; б — зависимость тока от концентрации глюкозы в измерительной ячейке для биосенсора с 1 (1), 5 (2) и 10 (3) монослоями РС—СТАВ / глюкозооксидаза

белковых глобул. В случае смешанных монослоев РС — СТАВ положительно заряженные аммониевые группы СТАВ экранируют отрицательно заряженные фосфатные группы фосфатидилхолина и поверхность монослоя приобретает суммарный положительный заряд. Таким образом, высокую адсорбцию фермента на смешанные монослои РС — СТАВ можно объяснить электростатическим взаимодействием отрицательно заряжен-

ных участков белковых глобул с положительно заряженными аммониевыми и холиновыми группами ПАВ.

Одновременно была оценена активность и распределение фермента в «ленгмюровской ванне» (рис. 3). Амперометрическим методом определялась активность фермента в пробах, отобранных из различных частей «ванны». Как видно из рис. 3, активность фермента вблизи липидного монослоя (РС — СТАВ = 1 : 1, № 3) примерно в 2 раза выше, чем в водной субфазе на глубине 5 мм (№ 4), а также на поверхности и в субфазе за подвижным барьером (№ 5 и 6). Таким образом, белок эффективно сорбируется на липидном слое с сохранением ферментативной активности. Активность белка за измерительным барьером, где белок изначально не наносился, как на поверхности, так и в субфазе (№ 1 и 2) пренебрежимо мала. Активность адсорбционных слоев белка на границе раздела вода — воздух в отсутствие липидного монослоя (рис. 3, № 3, заштрихованный) почти в 2 раза ниже, чем в водной субфазе (№ 4, заштрихованный) или за подвижным барьером (№ 5 и 6, заштрихованные). По-видимому, глюкозооксидаза частично денатурирует на поверхности в этих условиях. Таким образом, наличие липидного монослоя не только приводит к концентрированию белка на границе раздела фаз, но и способствует сохранению его ферментативной активности.

Полученные липид-белковые монослои стабильны при высоких поверхностных давлениях 20—40 мН/м, что позволяет переносить их на различные твердые подложки (в том числе специальные электроды) с образованием мультислойных структур заданной толщины для создания биосенсоров (рис. 4). Коэффициент переноса, определяемый как отношение уменьшения площади монослоя к площади погружаемой части электрода, составлял $0,95 \pm 0,05$, что свидетельствует о полном переносе монослоев с водной субфазы на твердые подложки. Таким способом были получены электроды, содержащие от 1 до 10 липид-белковых монослоев.

Типичный амперометрический сигнал полученного биосенсора на впрыскивание раствора глюкозы в измерительную ячейку приведен на рис. 5а. Сигнал достигает максимального значения 0,5—0,8 нА через 10 с после добавления раствора глюкозы (3,2 мМ глюкоза в измерительной ячейке, чувствительность 2 нА/см). Через 30 с (после промывки ячейки буферным раствором) биосенсор готов к следующему измерению. В серии из 10 последовательных измерений биосенсором одинаковых концентраций глюкозы величины амперометрических сигналов незначительно уменьшаются, достигая постоянных значений к 4—5-му измерению, что свидетельствует о достаточной стабильности полученного датчика.

Прослеживается четкая зависимость амперометрического сигнала биосенсора от концентрации глюкозы. Линейное возрастание сигнала наблюдается в области концентраций 0,5—5,0 мМ глюкозы в измерительной ячейке (рис. 5б, 2). При дальнейшем увеличении концентрации глюкозы рост сигнала становится нелинейным, что можно объяснить либо субстратным насыщением молекул фермента, либо кинетическим контролем амперометрического сигнала. В отличие от данных японских исследователей [2, 7] нами была обнаружена резкая зависимость величины сигнала от числа нанесенных на электрод липид-белковых монослоев (рис. 5б). Так, при увеличении числа монослоев от 1 до 10 амперометрический сигнал увеличивается от 0,3 до 2,0 нА.

Была обнаружена линейная зависимость величины сигнала от значения поверхностного давления в области 20—40 мН/м, при котором осуществляется перенос липид-белковых монослоев на Pt-электрод. Действительно, с увеличением давления, т. е. с увеличением плотности липид-белкового монослоя, на электрод переносится большее количество фермента, что вызывает рост величины сигнала на неизменное количество субстрата.

Таким образом, исследована адсорбция глюкозооксидазы на монослоях различных ПАВ и получены на их основе методом Ленгмюра — Блоджетт мультислойные структуры заданной толщины на поверхности Pt-

электродов (биосенсоров). Показана возможность с помощью полученных биосенсоров измерять концентрацию глюкозы в области 0,5—5,0 мМ. Обнаружена зависимость величины амперометрического сигнала на глюкозу от числа липид-белковых монослоев на электроде и величины поверхностного давления, при котором осуществляется указанный перенос.

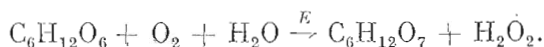
Экспериментальная часть

В работе использовали органические растворители, неорганические соли и кислоты марки ос. ч. или ч.д.а., стеариновую кислоту (СК) (Союзреактив); фосфатидилхолин (ФХ) (Sigma, США); СТАВ (Chemapol, ЧСФР); глюкозооксидазу (VEB Arzneimittelwerk, Dresden, ГДР).

Монослой липидов получали на компьютерной установке «Film Balance 2» (Lauda, ФРГ), работающей по принципу весов Ленгмюра [9]. На тщательно очищенную водную поверхность (1 мМ фосфатный буфер, pH 7,0), между подвижным и измерительным барьерами микроприцем (Hamilton, США) наносили 20 мкл 10 мМ растворов липидов в хлороформе и 200 мкл растворов глюкозооксидазы (10 мг/мл) в 1 мМ фосфатном буфере.

Перенос липид-белковых монослоев на Pt-электроды осуществляли методом Ленгмюра — Блоджетт (вертикальным перемещением подложки через поверхность монослоя) со скоростью 1 см/мин при постоянном давлении 20—40 мН/м. Для количественного переноса необходимо каждый снятый на подложку монослой тщательно высушивать в токе азота перед следующим нанесением. Таким образом были получены мультислойные пленки, содержащие до 10 липид-белковых монослоев.

Для получения биосенсоров использовали Pt-электроды (0,2 мм²), напыленные на керамические пластины. Биосенсор и электрод Ag/AgCl помещали в измерительную ячейку, содержащую 3 мл 10 мМ фосфатного буфера с pH 7,2, при 20° С с постоянным перемешиванием. Электроды подсоединяли к полярографу (GUP 673, ZUG Berlin, ГДР) и устанавливали рабочий потенциал +0,6 В против электрода Ag/AgCl [6] для определения перекиси водорода, образующейся при реакции ферментативного окисления глюкозы в соответствии с уравнением



Калибровку чистых Pt-электродов проводили по 4 мМ раствору перекиси водорода. Для измерения активности и распределения глюкозооксидазы в ленгмюровской «ванне» по 200 мкл растворов, отобранных из различных частей «ванны», добавляли в стандартную измерительную ячейку, содержащую 3,2 мМ глюкозу. Через 5 мин регистрировались значения амперометрического сигнала. Для сравнения в аналогичную ячейку добавляли 10 мкл исходного раствора глюкозооксидазы концентрации 10,0 мг/мл.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Biosensors. Fundamentals and Applications. N. Y.: Oxford Univ. Press, 1987. 770 p.
2. Morizumi T. // Thin Solid Films. 1988. V. 160. P. 413—429.
3. Ерохин В. В., Каюшина Р. Л., Львов Ю. М., Захарова Н. И., Кононенко А. А., Покс П. П., Рубин А. Б. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 299. № 5. С. 1262—1266.
4. Лукашев П. Е., Зайцев С. Ю., Кононенко А. А., Зубов В. П. // Докл. АН СССР. 1989. Т. 308, № 1. С. 225—230.
5. Hong F. // BioSystems. 1986. V. 19. P. 223—236.
6. Scheller F., Kirstein D., Kirstein L., Schubert F., Wollenberger U., Olsson B., Gorton L., Johansson G. // Phil. Trans. R. Soc. Lond. 1987. V. 361. P. 85—94.
7. Sriyudthsak M., Yamagushi H., Morizumi T. // Thin Solid Films. 1988. V. 160. P. 463—469.
8. Okahata Y., Tsuruta T., Ijiro K., Ariga K. // Langmuir. 1988. V. 4. P. 1373—1375.
9. Адамсон А. Физическая химия поверхностей. М.: Мир, 1979. 568 с.

Поступила в редакцию
30.V.1990

После доработки
15.I.1991

S. YU. ZAITSEV, Th. HANKE*, U. WOLLENBERGER*, B. EBERT*,
N. A. KALABINA, V. P. ZUBOV, F. SCHELLER*

MONO- AND MULTILAYER MEMBRANES WITH ADSORBED GLUCOSE
OXIDASE

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy
of Sciences of the USSR, Moscow;*

** Central Institute of Molecular Biology, DDR Academy of Sciences, Berlin-Buch*

Adsorbed layers of glucose oxidase on the air/water interface were prepared and investigated. The transfer of one to ten lipidprotein monolayers onto Pt-electrodes under 20—40 mN/m surface pressure by Langmuir — Blodgett method was performed to yield a biosensor with a measuring range of 0,5—5,0 mM glucose. The amperometric response of the biosensor to glucose depends on the number of the transferred lipid-protein monolayers and on the surface pressure in the course of the transfer.]