Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт биофизики Сибирского отделения Российской академии наук»

На правах рукописи

Ронжин Никита Олегович

ИНДИКАТОРНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОАЛМАЗОВ ДЕТОНАЦИОННОГО СИНТЕЗА

03.01.06 – биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Бондарь Владимир Станиславович

Красноярск – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5
ГЛАВА 1 Ферментативные методы анализа и иммобилизация ферментов 11
1.1 Ферментативные методы анализа 11
1.2 Иммобилизованные ферменты 13
1.3 Носители для иммобилизации ферментов 17
1.4 Методы иммобилизации ферментов 19
1.5 Наноалмазы как носители иммобилизованных ферментов 26
1.6 Биолюминесцентное тестирование 31
1.7 Ферментативные методы определения глюкозы и холестерина 34
ГЛАВА 2 Материалы и методы 41
2.1 Материалы и реагенты 41
2.2 Функционализация поверхности МНА 43
2.3 Адсорбция люциферазы на частицы МНА 44
2.4 Конструирование биолюминесцентной тест-системы 45
2.5 Ковалентная иммобилизация ферментов на частицы МНА 47
2.6 Определение емкости МНА при иммобилизации ферментов 48
2.7 Оценка активности комплексов МНА-ферменты 49
2.8 Динамика образования продукта реакции окислительного азосочетания 50
2.9 Многократное использование комплексов МНА-ферменты 51
2.10 Оценка активности комплексов МНА-ферменты в зависимости от физико-химических параметров среды 52
2.11 Оценка образования продукта реакции, катализируемой комплексами МНА-ферменты, в зависимости от концентрации анализируемого вещества 53
2.12 Определение концентраций глюкозы и холестерина в сыворотке крови человека *in vitro* 53

2.13 Измерение интенсивности свечения люциферазы 54
2.14 Определение элементного состава МНА..... 54
ГЛАВА 3 Исследование каталитической функции МНА в реакции окислительного азосочетания 55
3.1 Реакция окислительного азосочетания, катализируемая частицами МНА 55
3.2 Участие поверхностных микропримесей металлов в каталитической активности МНА 57
3.3 Элементный анализ поверхностных примесей МНА..... 59
ГЛАВА 4 Конструирование и изучение свойств биолюминесцентной тест-системы на основе МНА, люциферазы и полимерной матрицы..... 63
4.1 Создание и изучение комплекса МНА-люцифераза 63
4.2 Выбор оптимальной полимерной матрицы..... 66
4.3 Конструирование тест-системы на основе полимерной матрицы, МНА и люциферазы 69
4.3.1 Тест-система «полимерная матрица–МНА + люцифераза»..... 70
4.3.2 Тест-система «полимерная матрица + МНА + люцифераза»..... 75
4.3.3 Тест-система «полимерная матрица + комплекс МНА-люцифераза» . 77
4.4 Обоснование необходимости использования МНА в конструировании индикаторных тест-систем..... 79
4.5 Получение индикаторного комплекса МНА-люцифераза с использованием белкового экстракта 82
4.6 Тест-система «полимерная матрица–брушит + люцифераза» 85
4.7 Тест-система «полимерная матрица + комплекс МНА-брушит-люцифераза» 87
4.8 Получение индикаторной тест-системы в высушенном виде..... 89
ГЛАВА 5 Конструирование и исследование свойств систем биохимического определения глюкозы и холестерина на основе МНА и ферментов 91

5.1 Концепция создания систем биохимического определения глюкозы и холестерина 91
5.2 Ковалентная иммобилизация ферментов на поверхность МНА 92
5.3 Исследование комплексов МНА-иммобилизованные ферменты 94
5.4 Оценка практического применения сконструированных систем в сыворотке крови *in vitro* 104
5.5. Оценка длительного хранения сконструированных тест-систем 106
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 108
ВЫВОДЫ 110
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 112
ЛИТЕРАТУРА 113

ВВЕДЕНИЕ

Развитие нанотехнологии открывает новые возможности эффективного решения широкого спектра задач, возникающих в различных сферах деятельности человека. Внедрение наноматериалов и нанотехнологий в биологию, биотехнологию, медицину, фармакологию, экологию будет способствовать их выходу на новый качественный уровень. В этом направлении мировым научным сообществом проводятся исследования с наночастицами разной физико-химической природы, а список исследуемых объектов и решаемых задач чрезвычайно широк (Nikitin et al., 2010; Purtov et al., 2010; Wang et al., 2010; Lopez-Moreno et al., 2010; Lad, Agrawal, 2012; Lamanna et al., 2012; Kaur, Badea, 2013; Mieszawska et al., 2013; Goenka et al., 2014).

В последние годы исследователи проявляют большой интерес к биомедицинскому применению разных форм наноуглерода (угольные порошки, графит, наноалмазы, графен, алмазные пленки, фуллерены, углеродные нанотрубки) (Batory et al., 2012; Raza et al., 2012; Tan et al., 2013). Одним из перспективных материалов этой группы являются наноалмазы, получаемые методом взрывного синтеза (Ставер и др., 1984; Mochalin et al., 2011), который впервые разработан российскими учеными (Даниленко, 2004). В настоящее время производство наноалмазов методом взрыва осуществляется в России и ряде зарубежных стран (Китай, Украина, Белоруссия, Болгария).

До недавнего времени наноалмазы применялись, главным образом, как материал технического назначения (в полировальных композициях, защитных покрытиях, композиционных материалах, присадках к маслам и консистентным смазкам и т.д.).

В то же время, физико-химические свойства наноалмазов (высокоразвитая и химически активная поверхность, возможности ее химической модификации, малая токсичность, температурная, радиационная и катаболическая устойчивость и т.д.), позволяют прогнозировать их применимость для биотехнологических и

биомедицинских целей (Krueger et al., 2008; Schrand et al., 2009; Say et al., 2011; Mochalin et al., 2011; Shugalei et al., 2013; Ho et al., 2015).

Одной из актуальных задач в современной нанобиотехнологии является разработка новых эффективных средств индикации и диагностики (включая системы многоразового использования), расширяющих арсенал известных методов, применяемых в медицинской диагностике и экологическом мониторинге (Manjunathaa et al., 2012; Phongphut et al., 2013; Nadifiyine et al., 2013; Caseroa et al., 2013; Yang, Zhang, 2013). Для специалистов, работающих в данной области, несомненный интерес могут представлять модифицированные наноалмазы (МНА) взрывного синтеза, образующие свободнодисперсные системы и адаптированные для медико-биологических исследований (Бондарь, Пузырь, 2004; Патент № 2252192, 2005). Физико-химические свойства МНА (сочетание химически полиморфной, активной поверхности и высокой коллоидной устойчивости в дисперсионных средах) (Бондарь, Пузырь, 2004; Puzyr et al., 2005; Gibson et al., 2009), открывают возможности их применения в разработке и создании новых материалов и технологий для биологии, медицины, фармакологии, экологии (Бондарь, Пузырь, 2005; Бондарь, 2011). В частности, прогнозируется перспективность применения МНА как основы для конструирования новых систем диагностики и адресной доставки веществ (Puzyr et al., 2007; Purtov et al., 2010; Пуртов и др., 2011; Purtov et al., 2011; Man, Ho, 2013).

Исходя из изложенных выше фактов, **целью работы являлось** изучение применимости МНА как основы в конструировании индикаторных и диагностических систем многоразового использования.

Достижение поставленной цели требовало решения следующих задач:

1. На примере реакции окислительного азосочетания исследовать каталитический эффект МНА при взаимодействии органических соединений и

оценить применимость данных наночастиц для создания средств индикации фенола.

2. Изучить применимость МНА в создании биолюминесцентной индикаторной тест-системы посредством неспецифической адсорбции светоизлучающего фермента люциферазы на поверхность наночастиц и оценить свойства полученного комплекса МНА-люцифераза.
3. Исследовать применимость МНА в конструировании систем биохимического определения глюкозы и холестерина с помощью одновременной ковалентной иммобилизации на поверхности наночастиц нескольких ферментов – глюкозооксидазы и пероксидазы для индикации глюкозы; холестеринэстеразы, холестериноксидазы и пероксидазы для индикации холестерина.
4. Оценить функциональную активность полученных тест-систем биохимической диагностики МНА-ферменты при разных физико-химических условиях среды (температура, pH, состав буферной системы), многократном использовании и длительном хранении.
5. Провести сравнительный анализ количественного определения глюкозы и холестерина в образцах сыворотки крови человека *in vitro* с использованием тест-систем МНА-ферменты и полифункционального биохимического анализатора, применяемого в клинических лабораториях.

Положения, выносимые на защиту:

1. На примере реакции окислительного азосочетания показан каталитический эффект МНА при взаимодействии органических соединений, что открывает возможность создания новых способов индикации химических веществ, в частности, фенола.
2. Показано, что МНА могут использоваться в качестве носителя для адсорбции и ковалентной пришивки ферментов с сохранением их каталитической

функции, что открывает возможности конструирования новых многоразовых систем индикации и биохимической диагностики.

Научная новизна и практическая значимость

Все результаты, представленные в данной работе, получены впервые и носят как фундаментальный, так и прикладной характер. В работе демонстрируется нетрадиционное применение наночастиц алмаза как материала биотехнологического назначения: как катализатора в реакциях взаимодействия органических соединений, на примере реакции окислительного азосочетания (4-аминоантипирин – фенол – перекись водорода); в качестве носителя биомолекул (ферментов), сохраняющих функциональную активность после адсорбции и ковалентной пришивки на наночастицы.

Показано, что частицы МНА могут использоваться для создания новых эффективных индикаторных и диагностических систем многоразового использования: для экологического мониторинга загрязнений окружающей среды фенолом и его соединениями; в биолюминесцентном микроанализе; а также для количественного определения глюкозы и холестерина в сыворотке крови человека *in vitro*.

Полученные индикаторные системы многоразового действия могут быть эффективны при их использовании, например, в исследовательских целях для проведения быстрого и недорогого анализа в лабораторных условиях. Так как в большинстве случаев в процессе какого-либо исследования выполняется значительное число экспериментов (реакций) с многими повторами и разными вариантами исполнения, расходуется значительное количество ферментных реагентов, которые используются однократно, так как после проведения реакции вся смесь, включающая ферменты, выливается. Исходя из этого, разработанные и сконструированные в данной работе многоразовые тест-системы имеют значительные преимущества. Использование полученных систем позволяет в разы сократить расход ферментных препаратов, что является выгодным

преимуществом с экономической точки зрения, а также позволяет проводить необходимые исследования в отсутствии дорогостоящего специализированного оборудования (в случае определения концентрации глюкозы и холестерина), ограничиваясь традиционным прибором – спектрофотометром, который широко используется в лабораториях.

С теоретической точки зрения, полученные результаты добавляют новую информацию о физико-химических свойствах поверхности частиц МНА взрывного синтеза и расширяют наши представления о применения данного наноматериала в конструировании индикаторных и диагностических систем на основе комплексов наноалмазы-ферменты. Полученные в этой работе результаты расширили фундаментальные знания о каталитических свойствах наночастиц алмаза детонационного синтеза; выявили существование нескольких механизмов адсорбционного связывания белковых молекул (ферментов) с поверхностью наночастиц; показали возможность осуществления одновременного ковалентного связывания сразу нескольких ферментов на поверхность наночастиц.

Апробация работы

Результаты исследований опубликованы в 5-х статьях, включая 3 публикации в журналах, рекомендованных ВАК. Материалы диссертационной работы представлены на: V Съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015); IV Международной научно-практической конференции «Теоретические и прикладные аспекты современной науки» (Белгород, 2014); Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых учёных-биологов «Симбиоз-Россия 2013» (Иркутск, 2013); IV Съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012); Четырнадцатой международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные исследования, разработка и применение высоких технологий в промышленности и экономике» (С-Петербург, 2012); Научно-технической конференции с международным участием «VI Ставеровские чтения» (Бийск, 2012); Конференции с международным участием «Настоящее и

будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности» (Ульяновск, 2011); Конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных-физиков НКСФ-XXXVII и НКСФ-XXXVIII (Красноярск, 2008, 2009); Конференциях аспирантов и молодых ученых-исследователей ИБФ СО РАН и КНЦ СО РАН (Красноярск, 2011, 2012).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 125 страницах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, описание методов исследования, изложение результатов исследования, заключение, выводы и список цитируемой литературы (118 источников, включая 66 иностранных). Работа содержит 40 рисунков, 3 таблицы.

ГЛАВА 1 Ферментативные методы анализа и иммобилизация ферментов

1.1 Ферментативные методы анализа

Ферментативные методы анализа используются для количественного определения химических веществ в растворе и основаны на использовании химических реакций с участием ферментов. Ферментативные методы анализа позволяют определять вещества, способные участвовать в химических реакциях, катализируемых ферментами (субстраты, сами ферменты, коферменты), а также являющиеся активаторами или ингибиторами ферментов (Березин, Клесов, 1976).

В последние примерно двадцать лет в клинической биохимии ферментативные методы анализа постепенно вытесняют химические благодаря своим преимуществам. Ферментативные методы, в отличие от химических, обладают гораздо большей чувствительностью и специфичностью (практически не дают интерференции), низкой температурой реакций (температура реакции не превышает 37 °С), водной инкубационной средой (отсутствие токсических веществ) (Яковлева, 2005).

Высокая селективность ферментативных методов анализа обусловлена образованием фермент-субстратного комплекса в процессе каталитического акта, который требует структурного соответствия активного центра фермента и субстрата. Ферменты способны катализировать превращения веществ с большой скоростью и высоко избирательно, даже если анализируемое соединение находится в смеси с другими близкими по химическому строению веществами. Поэтому большинство ферментов проявляют свою активность только в реакциях с субстратом одного определенного типа или с группой субстратов, имеющих общие структурные группы (Кочетов, 1981; Березин, Клесов, 1976; Овчинников, 1987; Клесов, Березин, 1980; Клесов, Березин, 1984).

Содержание искомого компонента определяют либо по количеству конечного продукта ферментативной реакции, либо, по начальной скорости процесса, положенного в основу методики определения. Для наблюдения за

скоростью ферментативной реакции чаще всего применяют электрохимические, люминесцентные и спектрофотометрические методы детекции (Альбертсон, 1974; Нидервайзер, 1974; Кочетов, 1981; Угарова, Бровко, 1981; Гительзон и др., 1984; Скоупс, 1985; Дарбре, 1989; Illarionov et al., 2000).

Ферментативные методы анализа часто включают системы, состоящие из нескольких сопряженных реакций, катализируемых разными ферментами. Так, например, в случае систем из двух реакций продукты первой ферментативной реакции являются субстратами для второй ферментативной реакции (индикаторной), что позволяет повысить чувствительность определения того или иного соединения и при необходимости изменить способ детекции (Петушков и др., 1984; Frost, 2004; Casabuono et al., 2005).

Основными областями применения ферментативных методов анализа являются клиническая медицина и экспериментальная биохимия. С помощью ферментов определяют малые количества физиологически активных веществ, метаболитов, ферментов, мутагенов, канцерогенов, лекарственных препаратов в крови, моче, тканях и других биологических объектах. Ферментативные методы используют также в пищевой и фармакологической промышленности, в экологическом мониторинге для контроля загрязнений окружающей среды.

Как было сказано выше, достоинствами ферментативных методов анализа являются: высокая чувствительность, обусловленная активностью ферментов, природой индикаторных реакций (с помощью которых определяют вещество) и способами детекции аналитического сигнала; высокая селективность и мягкие условия проведения анализа. Однако ферментативные методы анализа имеют некоторые недостатки. Они обусловлены рядом особенностей ферментов: потерей функциональной активности и стабильности ферментов под воздействием различных факторов; высокой стоимостью из-за невозможности многократного использования растворимых ферментов и трудности их выделения и очистки.

Применение иммобилизованных ферментов расширило возможности ферментативных методов анализа. Более высокая стабильность и возможность

многократного использования иммобилизованных ферментов позволили снизить стоимость анализов, повысить экспрессность, проводить химический анализ в потоке и автоматизировать ферментативные методы (Туркова, 1978; Тривен, 1983; Березин и др., 1987; Березин и др., 1987а; Егоров и др., 1987; Вудворт, 1988; Аберкромби и др., 1988).

Очевидно, что исследования, направленные на развитие представлений о механизмах взаимодействия биомакромолекул (например, белков) с поверхностью носителей, во многом, будет способствовать разработке новых систем индикации и диагностики на основе иммобилизованных ферментов. В этой области многообещающим и перспективным направлением исследований является изучение возможности использования наночастиц разной физико-химической природы как основы конструирования новых индикаторных систем регистрации. Перспективность этого направления очевидна и с позиции активно развивающейся в настоящее время биотехнологии в целом, и с позиции отдельной ее отрасли – нанобиотехнологии. В частности, отмечается заметный рост интереса к поиску новых методических подходов в разработке и создании миниатюрных полифункциональных систем регистрации, пригодных для использования в различных сферах биологии и медицины (Puzyr et al., 2007; Purtov et al., 2011; Пуртов и др., 2001; MacBeath, 2002; Пузырь и др., 2004; Warren et al., 2004; Stoll et al., 2005; Poetz et al., 2005; Ронжин и др., 2010).

1.2 Иммобилизованные ферменты

В растворе молекулы ферментов диспергированы по всему объёму, свободно перемещаясь в нем. Ферментативная иммобилизация является специально разработанным методом для значительного ограничения свободы передвижения ферментов. Иммобилизованные ферменты представляют собой ферменты, которые закреплены на инертном, нерастворимом материале (носителе) или заключены в полупроницаемую мембранную систему. Иммобилизация может обеспечить ферменту повышенную устойчивость к

изменениям условий среды, таких как, например, pH или температуры. Также иммобилизация позволяет ферментам удерживаться на определенном месте течение всей реакции, после чего их легко отделить от продуктов реакции и использовать повторно.

Впервые иммобилизованные ферменты были получены в 1916 году. Тогда Дж. Нельсон и Е. Гриффин показали, что инвертаза, иммобилизованная на угле посредством адсорбции, сохраняет каталитическую активность. В 1939 г. Дж. Пфанмюллер и Г. Шлейх получили первый патент на применение адсорбированных на древесных опилках протеолитических ферментов для обработки шкур. Новый этап практического применения иммобилизованных ферментов начался после создания прочных конъюгатов ферментов с носителями, когда в 1953 г. Н. Грубхофер и Д. Шлейт впервые применили метод ковалентного связывания (Тривен, 1983; Березин и др., 1987; Егоров и др., 1987; Вудворт, 1988).

Значительный вклад внесли группы Г. Манеке и Э. Качальского. В результате связывания фермента на носителе были созданы гетерогенные катализаторы, для которых на первой конференции по инженерной энзимологии в Хенникере (США) в 1971 г., был узаконен термин «иммобилизованные ферменты». В литературе также встречаются и другие термины, например «нерастворимые ферменты», «матрицированные ферменты» и т. п., смысл которых достаточно конкретен – ими обозначают препараты ферментов, связанных на нерастворимых носителях. Однако понятие «иммобилизация» нужно понимать шире, а именно, как любое ограничение свободы движения белковых молекул в пространстве (Березин и др., 1987; Егоров и др., 1987).

Применение иммобилизованных ферментов расширило возможности ферментативных методов анализа. Более высокая стабильность и возможность многократного использования иммобилизованных ферментов позволили снизить стоимость анализов, повысить экспрессность, проводить химический анализ в потоке и автоматизировать ферментативные методы. Впервые иммобилизованные ферменты в химическом анализе применили в середине 60-х гг. 20 века. Для

обнаружения фосфорорганических пестицидов в воздухе использовали холинэстеразу, включенную в крахмальный гель, нанесенный на полиуретановую пластинку. С помощью глюкозооксидазы или лактатдегидрогеназы, включенных в полиакриламидный гель, определяли соответственно глюкозу или молочную кислоту. Помимо единичных иммобилизованных ферментов, в химическом анализе используют соиммобилизованные ферментные системы, позволяющие повышать чувствительность и селективность определения (Тривен, 1983; Березин и др., 1987; Егоров и др., 1987; Вудворт, 1988; Кулис, 1981).

В полиферментных комплексах активность каждой компоненты, как правило, превышает активность изолированного фермента в гомогенном растворе. Объясняется это в первую очередь тем, что в комплексе за счет пространственного сближения и диффузионных ограничений могут локально концентрироваться промежуточные соединения: субстраты, активаторы, ингибиторы. Эффекта локального концентрирования удается добиться при иммобилизации сразу нескольких ферментов на одном носителе. Первая искусственная биферментная система, основанная на иммобилизованных ферментах, была создана К. Мосбахом (1970). Гексокиназу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу ковалентно присоединяли к носителю. По сравнению с системой двух ферментов в растворе эффективность возросла на 40 – 140 %. (Березин и др., 1987).

При иммобилизации происходит стабилизация каталитической активности ферментов, так как этот процесс препятствует денатурации белков. Иммобилизованный фермент, имеющий ограниченную возможность для конформационных перестроек, быстрее растворимого находит кратчайший путь к функционально активной конформации. После иммобилизации ферменты приобретают, помимо стабильности, новые свойства, не характерные для их свободного состояния, например, возможность функционировать в неводной среде, более широкие зоны оптимума по температуре и pH (Тривен, 1983; Березин и др., 1987; Вудворт, 1988; Кулис, 1981).

Длительность сохранения каталитической активности и ряд свойств ферментов определяются правильностью выбора носителя, метода и условий проведения иммобилизации. Прикрепление фермента к носителю может осуществляться посредством адсорбции, химической пришивки или путем механического включения фермента в органический или неорганический гель (сферу, капсулу и т. п.). При этом допускается прикрепление фермента только за счет функциональных групп, не входящих в его активный центр и не участвующих в образовании фермент-субстратного комплекса. Носитель фермента (или матрица) может иметь вид зернистого материала, волокнистой структуры, пластинчатой поверхности, пленок или тканей, полых волокон, трубочек, капсул и т. д. Также большое значение имеет размер частиц носителя и отношение площади его поверхности к объему (Березин и др., 1987; Егоров и др., 1987).

Преимуществами иммобилизованных ферментов перед нативными являются (Березин и др., 1987):

1) Гетерогенный катализатор легко отделим от реакционной среды, что дает возможность остановить реакцию в любой момент, использовать фермент повторно, а также получать чистый от фермента продукт.

2) Ферментативный процесс с использованием иммобилизованных ферментов можно проводить непрерывно, регулируя скорость катализируемой реакции и выход продукта.

3) Модификация фермента целенаправленно изменяет его свойства, такие как специфичность (особенно в отношении макромолекулярного субстрата), зависимость каталитической активности от pH, ионного состава и других параметров среды, стабильность к денатурирующим воздействиям.

4) Можно регулировать каталитическую активность иммобилизованных ферментов путем изменения свойств носителя действием физических факторов, таких как свет и звук.

В результате внедрения нового класса биоорганических катализаторов – иммобилизованных ферментов, перед прикладной энзимологией открылись новые пути развития.

1.3 Носители для иммобилизации ферментов

Ключевыми факторами при иммобилизации фермента являются выбор материала носителя и метод иммобилизации. Поскольку требования к белковым адсорбентам значительно отличаются от требований, предъявляемых к адсорбентам низкомолекулярных соединений то, для получения иммобилизованных ферментов используется ограниченное число как органических, так и неорганических носителей, (Березин и др., 1987). К носителям для иммобилизации ферментов предъявляются следующие требования (Таблица 1.1).

Таблица 1.1

Ключевые требования при выборе материала носителя и метода иммобилизации.

Свойства	Ключевые требования
Физические	Прочность частиц, доступность поверхностной площади, форма (гранулы, пластины, волокна), степень пористости, объём пор, проницаемость для ферментов и субстратов
Химические	Гидрофильность, инертность по отношению к ферментам, доступность функциональных групп для модификации, восстановление/повторное использование носителя
Стабильность	Сохранение, остаточная активность фермента
Устойчивость	Разрушение химическими веществами, pH, температурой, органическими растворителями
Безопасность	Биосовместимость, токсичность компонентов реагентов, здоровье и безопасность рабочих и безопасность конечного продукта для пользователей, спецификации

	иммобилизованного препарата для пищевого, фармацевтического и медицинского применения
Рентабельность	Доступность и стоимость носителя, химических веществ, спецоборудования, реактивов, влияние на окружающую среду, многоразовость носителя
Реакция	Расход, нагрузка фермента и каталитическая производительность, кинетика реакции, побочные реакции, многоферментные системы.

Отсутствие носителей, удовлетворяющих одновременно всем этим требованиям, и разнообразие задач, стоящих перед экспериментаторами, обуславливают широкий набор применяемых для иммобилизации материалов (Березин и др., 1987).

Классификация носителей схематично представлена на Рисунке 1.1:

Рисунок 1.1 – Классификация носителей для иммобилизации ферментов.

Следует отметить, что органические носители (как низко-, так и высокомолекулярные) могут быть природного или синтетического происхождения. Природные полимерные органические носители делят в соответствии с их биохимической классификацией на 3 группы: полисахаридные, белковые и липидные. Синтетические полимеры также можно разделить на

группы в связи с химическим строением основной цепи макромолекул: полиметиленовые, полиамидные, полиэфирные (Casabuono et al., 2005; Березин и др., 1987; Егоров и др., 1987; Остерман, 1985; Даванков и др., 1989).

1.4 Методы иммобилизации ферментов

Существуют две принципиально различных группы методов иммобилизации ферментов:

1. Физические методы иммобилизации – без возникновения ковалентных связей между ферментом и носителем;
2. Химические методы иммобилизации – с образованием ковалентной связи между ферментом и носителем.

Данные методы представлены на схеме ниже (Рисунок 1.2):

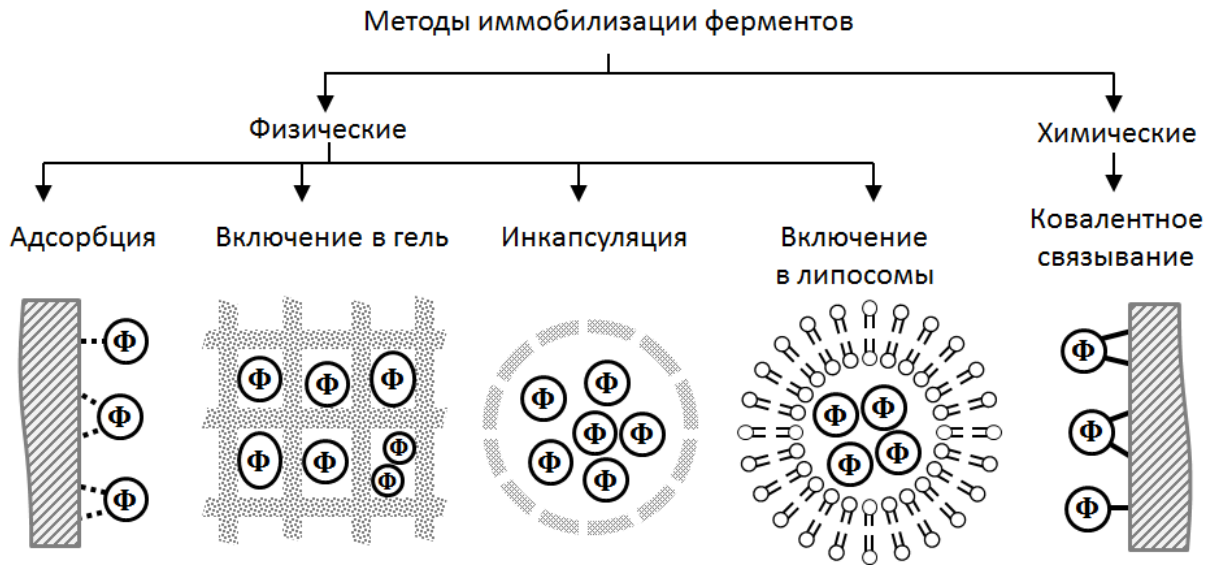


Рисунок 1.2 – Классификация и методы иммобилизации ферментов.

1) Адсорбция

Иммобилизация путём адсорбции (Рисунок 1.2) является самым простым методом и включает в себя обратимые поверхностные взаимодействия между ферментом и материалом носителя. Удерживание адсорбированной молекулы фермента на поверхности носителя обеспечивается в основном за счет

электростатических сил, таких как силы Ван-дер-Ваальса, ионных и водородных связей. Значительными могут быть и гидрофобные взаимодействия между носителем и поверхностными группами белка и координационные взаимодействия в случае наличия ионов металлов на поверхности носителя. Все эти силы очень слабы, но в довольно большом количестве они являются достаточно сильными. Вклад каждого из типов связывания зависит от химической природы носителя и функциональных групп на поверхности молекулы фермента (Messing, 1976; Woodward, 1985). При адсорбции действует существующая химия поверхности между ферментом и носителем. Таким образом, никакой химической активации (модификации) носителя не требуется и ферменты при этом способе иммобилизации подвергаются наименьшему повреждению. Процедура адсорбции состоит из смешивания биологического компонента и носителя, обладающего адсорбционными свойствами, в подходящих условиях pH, ионной силы в течение периода инкубации, последующего сбора иммобилизационного продукта и тщательной промывки для удаления не связавшихся биологических компонентов.

Преимуществами адсорбционной иммобилизации являются:

1. небольшие или вовсе отсутствующие повреждения ферментов;
2. простота, дешевизна и быстрота;
3. отсутствие необходимости проведения химических модификаций носителя или фермента.

Недостатки метода:

1. утечка, вымывание, десорбция ферментов из носителя и как следствие загрязнение продукта;
2. неспецифическое связывание;
3. возможная перегрузка носителя;
4. стерическое препятствие со стороны носителя.

Наиболее значительным недостатком является десорбция биокатализатора с поверхности носителя. Десорбция может происходить при различных изменениях окружающей среды: изменения pH, температуры и ионной силы. Иногда прочно

адсорбированный фермент легко десорбируется в процессе реакции в результате связывания субстрата или продукта реакции, или при других условиях, приводящих к изменению конформации белка. Также к десорбции могут приводить физические факторы, такие как скорость потока; встряхивание сосуда с образованием пузырьков; трение вида «частица-частица».

Неспецифическое связывание может происходить тогда, когда субстрат, продукт или остаточные загрязнения находятся в достаточно большом количестве. В таком случае они могут связываться с носителем. Это может привести к ограничению диффузии и как следствие к изменению кинетики реакции с последующим изменением параметров V_{max} и K_m (Goldsten, 1976). Кроме того, связывание протонов с носителем может привести к изменению pH микросреды вокруг носителя с последующим сдвигом оптимума pH (на 1-2 единицы pH), что может быть важным для ферментов с точным оптимумом pH (Rudge, Bickerstaff, 1984; Toher et al., 1990). Также важным моментом является контроль ферментной загрузки, так как перегрузка носителя может приводить к низкой каталитической активности и проблемам, связанным с пространственным затруднением.

2) Ковалентное связывание

Этот способ иммобилизации включает образование ковалентной связи между ферментом и материалом носителя. Ковалентная связь, как правило, образуется между функциональными группами, присутствующими на поверхности носителя и функциональными группами, принадлежащими аминокислотным остаткам на поверхности фермента. Ферменты имеют на своей поверхности достаточное количество аминокислотных функциональных групп для участия в образовании ковалентной связи. Наиболее часто используются аминогруппы (NH_2) лизина или аргинина, карбоксильные группы (COOH) аспарагиновой или глутаминовой кислоты, гидроксильные группы (OH) серина или треонина, сульфгидрильные группы (SH) цистеина (Srere, Uyeda, 1976).

Существование множества разнообразных материалов применяемых для создания носителей для ковалентного связывания, а также широкий спектр доступных носителей отражает тот факт, что не существует идеального или универсального носителя. Таким образом при рассмотрении возможных методов иммобилизации ферментов должны быть приняты во внимание все преимущества и недостатки того или иного носителя. На выбор конкретного носителя могут влиять многие факторы, но наиболее важным фактором для поддержания активности фермента является гидрофильность (Gemeiner, 1992). По этой причине популярными материалами для носителей для иммобилизации ферментов являются полисахаридные полимеры, обладающие высокой гидрофильностью. Например, для ферментной иммобилизации часто используются целлюлоза, декстран (Sephadex), крахмал, агароза (Sepharose).

Очень важно выбирать метод, который также не приведёт к инактивации фермента путём взаимодействия с аминокислотами в активном центре. Таким образом, если в активном центре фермента при катализе участвуют карбоксильные группы, имеет смысл выбрать реакцию, в которой применяются аминогруппы для ковалентной связи с носителем.

Процесс ковалентного связывания ферментов с носителем состоит в основном из двух этапов. На первом этапе функциональные группы, находящиеся на поверхности материала носителя активируются специфическим реагентом, на втором – ферменты добавляются в реакцию связывания для образования ковалентной связи с материалом носителя. Как правило, реакция активации предназначена для того, чтобы функциональные группы на носителе сделать сильно электрофильными (электрон-дефицитными). В реакции связывания эти группы будут реагировать с сильными нуклеофильными (источник электронов) группами, такими как аминогруппы (NH_2) определённых аминокислот на поверхности фермента с образованием ковалентной связи.

Однако стоит заметить, что ни один из методов иммобилизации не ограничивается конкретным типом материала носителя и существует большое

число возможных перестановок между методами иммобилизации и материалами носителей. Это достигается путём химической модификации собственных функциональных групп на носителе для получения ряда производных, содержащих различные функциональные группы. Например, общеизвестно, что у целлюлозы собственные функциональные группы – гидроксильные. Химическая модификация позволила создать ряд производных целлюлоз, таких как АЕ-целлюлоза (аминоэтил), СМ-целлюлоза (карбоксиметил) и DEAE-целлюлоза (диэтиламиноэтил). Таким образом, химическая модификация поверхности увеличивает диапазон методов иммобилизации, в которых может быть использован данный носитель.

Наиболее часто для целей ковалентной иммобилизации используют аминогруппы белка. Это обусловлено тем, что в белке их достаточно много, они высокореакционноспособны и играют второстепенную роль в поддержании структуры и функции ферментов (Остерман, 1985).

Однако обычные химические реагенты являются неспецифическими и, помимо аминогрупп, в реакциях модификации могут принимать участие и другие функциональные группы белка. Реакционная способность тех или иных групп белка существенным образом зависит от микро- и макро- условий (таких, как природа растворителя, pH среды, температура, структура фермента).

Существует множество приемов ковалентной химической иммобилизации белков. Одной из распространенных является реакция арилирования. Для этой цели используют гидроксилсодержащие носители, которые активируют предварительно бензохиноном (Purtov et al., 2010; Пуртов и др., 2011; Остерман, 1985; Brandt et al., 1975; Mateescu et al., 1989).

Процесс иммобилизации можно представить следующей схемой:

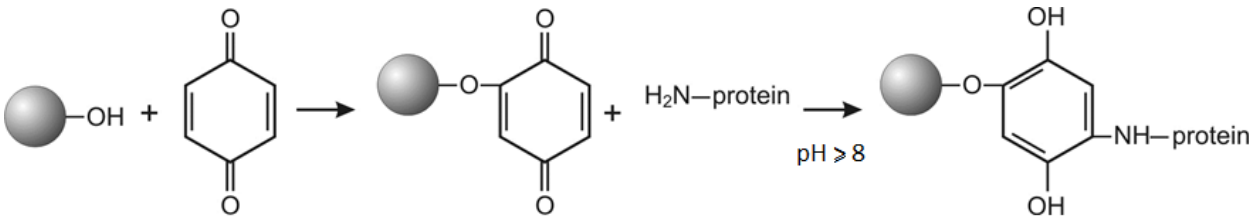


Рисунок 1.3 – Схема реакции активации носителя бензохиноном и иммобилизации белка

Химические методы иммобилизации очень широко применяются в лабораторной практике и используются в аффинной хроматографии, иммуноферментном анализе, тонком органическом синтезе, и многих других процедурах (Туркова, 1978; Березин и др., 1987; Аберкромби и др., 1988; Остерман, 1985; Porath et al., 1975; Бондарь и др., 1987; Бондарь и др., 1988). Кроме того, в химической сложности и гибкости методов ковалентной иммобилизации заложены широкие возможности создания препаратов иммобилизованных ферментов со строго определенными и контролируемыми свойствами, что особенно важно для целей медицины и высокочувствительных методов анализа (Березин и др., 1987).

3) Включение в гель

Иммобилизация в поры геля отличается от адсорбции и ковалентного связывания тем, что клетки (или молекулы фермента) свободны в растворе, но ограничены в движении структурой решётки геля. Пористость геля решётки подбирают таким образом, чтобы структура была достаточно плотной (чтобы предотвратить утечку фермента), но в то же время позволяла свободное движение субстрата и продукта. Безусловно, такая конструкция носителя может ограничивать диффузионные процессы и как следствие оказывать влияние на кинетику реакции, однако такой носитель может иметь и полезные преимущества – например, нежелательные белки или ферменты не имеют возможности

взаимодействия с иммобилизованным биокатализатором (Brodelius, 1985; Bucke, 1983).

Способ иммобилизации ферментов путём включения в трёхмерную структуру полимерного геля широко распространён благодаря своей простоте и уникальности. Метод применим для иммобилизации не только индивидуальных ферментов, но даже отдельных клеток. Иммобилизацию ферментов в геле осуществляют двумя способами:

1. Фермент вводят в водный раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате которой возникает пространственная структура полимерного геля с включёнными в его ячейки молекулами фермента.
2. Фермент вносят в раствор уже готового полимера, который впоследствии переводят в гелеобразное состояние.

Для первого варианта используют гели: полиакриламида, поливинилового спирта, силикагеля. Для второго: гели крахмала, агар-агара, агарозы, фосфата кальция.

Иммобилизация ферментов в гелях обеспечивает равномерное распределение молекул в объёме носителя. Все гели обладают высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкостью и обеспечивают возможность многократного использования фермента, включённого в его структуру.

4) Инкапсуляция

Этот метод разработан Т. Чангом в 1974 г. и состоит в том, что водный раствор фермента включается внутрь замкнутой микрокапсулы, стенки которой образованы полупроницаемым полимером (Kierstan, Coughlan, 1991; Nilsson, 1987; Grobotllot et al., 1994). Большие белки или ферменты не могут проникать через капсулу, тогда как низкомолекулярные субстраты и продукты могут свободно проходить через полупроницаемую мембрану. Один из механизмов

возникновения мембраны на поверхности водных микрокапсул фермента заключается в реакции межфазной поликонсистенции двух соединений, одно из которых растворено с водой, а другое – в органической фазе. Размер получаемых капсул составляет сотни микрометров, а толщина мембраны – сотые доли микрометра.

Достоинство метода микрокапсулирования – простота, универсальность, возможность многократного использования нативного фермента, поскольку он может быть отделён от непрореагировавшего субстрата процедурой простого фильтрования. Особенно существенно, что методом микрокапсулирования могут быть иммобилизованы не только индивидуальные ферменты, но и целые клетки, и отдельные фрагменты клеток. К недостаткам метода следует отнести невозможность инкапсулированных ферментов осуществлять превращения высокомолекулярных субстратов.

5) Включение в липосомы

Близким к инкапсулированию вариантом иммобилизации является метод включения водных растворов ферментов в липосомы, т. е. двойные липидные шарики. Впервые данный метод был применён для иммобилизации ферментов Дж. Вайсманом и Дж. Сессом в 1970 году. Для получения липосом из растворов липида (чаще всего лецитина) упаривают органический растворитель. Оставшуюся тонкую плёнку липидов выдерживают в водном растворе, содержащем фермент. В процессе выдержки происходит самовпитывание (самосборка) липидных структур липосомы, содержащих данный раствор фермента. Ферменты, иммобилизованные путём включения в структуру липосом, используют преимущественно в медицинских и биотехнологических целях.

1.5 Наноалмазы как носители иммобилизованных ферментов

В этом разделе обсуждаются вопросы возможного применения детонационных наноалмазов (НА) как наноматериала биотехнологического

назначения. За последние годы стремительно развивается весьма перспективное научное направление – нанотехнология, которое может внести свой вклад в различные сферы практической деятельности человека. Нанотехнология изучает свойства и возможности практического применения частиц крайне малого размера (от единиц до десятков и сотен нанометров) и разной физико-химической природы (кремний, золото, цинк, железо, алюмосиликаты, ферромагнитные и диамагнитные материалы и т.д.) для создания на их основе новых материалов и технологий для биологии, биохимии, медицины, экологии, фармакологии.

Для специалистов, работающих в данной области, несомненный интерес могут представлять наноалмазы (НА), получаемые методом детонационного синтеза (Ставер и др., 1984). НА (или другое название ультрадисперсные алмазы – УДА), синтезируются в виде первичных частиц среднего размера 4 – 6 нм из плазмы при детонации мощных взрывчатых веществ. В настоящее время производство НА взрывным синтезом осуществляется в России и ряде зарубежных стран (например, Китае, Украине, Болгарии), однако приоритет разработки этого метода принадлежит российским ученым (Даниленко, 2004).

На протяжении многих лет НА являлись объектом исследования у специалистов, работающих в области физики и химии твердого тела, материаловедения, электроники, электрохимии, и применялись исключительно для решения технических задач. Между тем, физико-химические свойства НА, прежде всего выраженный химический полиморфизм поверхности наночастиц (наличие широкого спектра химически активных функциональных групп, углеводородных фрагментов и микропримесей металлов) (Чиганова, 1994; Krueger, 2008a; Schrand et al., 2009), открывают перспективы их применения в биотехнологии как нового адсорбента для разработки эффективных методов сепарации и очистки биополимеров и основы для конструирования систем индикации и адресной доставки веществ (Purtov et al., 2010; Man, Ho, 2013; Патент № 2252192, 2005; Puzyr et al., 2007; Пуртов и др., 2011; Бондарь и др., 2008). Химические свойства поверхности взрывных НА, возникающие в ходе

технологического цикла их получения, включающего синтез с использованием энергии взрыва и последующую химическую очистку, наглядно демонстрирует теоретическая модель частицы НА (Рисунок 1.4), предложенная доктором О. Шендеровой (O. Shenderova, International Technology Center, Raleigh, NC, USA) (Dolmatov, Fujimura, 2005):

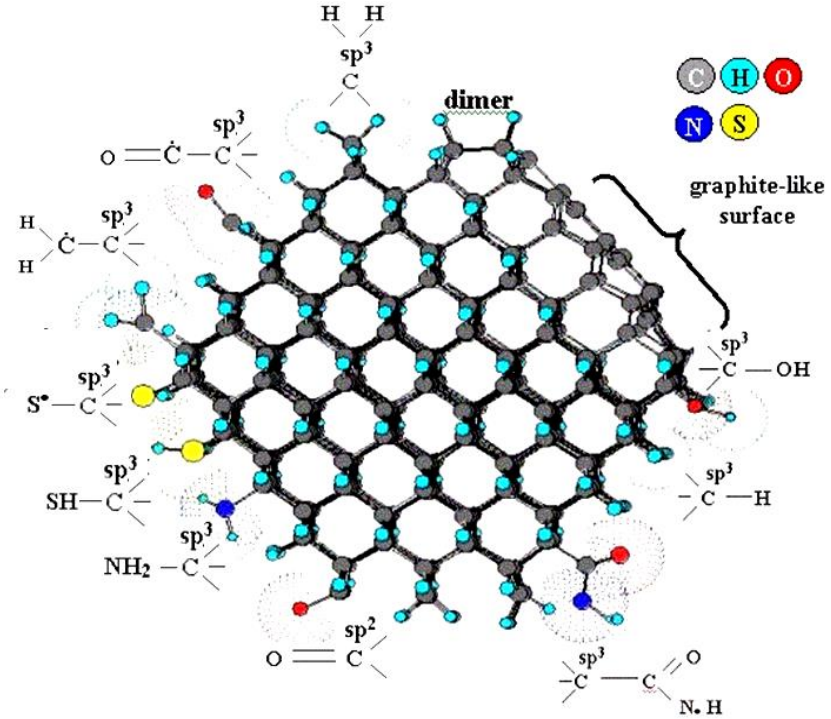


Рисунок 1.4 – Гипотетическая структура частицы наноалмаза.

К дополнительным достоинствам частиц НА с точки зрения их физико-химических свойств следует отнести также: размерный фактор первичных частиц (4 – 6 нм), обеспечивающий высокоразвитую (до 300 – 420 м^2/г) поверхность материала, высокую устойчивость к агрессивным факторам и механическую прочность. Однако следует заметить, что детонационные НА, имея несомненные достоинства, обладают рядом недостатков для биотехнологического применения, обусловленных их низкой коллоидной устойчивостью в дисперсионных средах и широким диапазоном кластеров наночастиц (до 10000 нм). Следствием этого являются: невозможность получения устойчивых гидрозолей наночастиц без обработки ультразвуком; трудности в получении строго определённых

концентраций НА в гидрозолях. Очевидно, что влиять на физико-химические свойства НА посредством модификации алмазного ядра невозможно. Поэтому изменить свойства НА можно, только модифицируя поверхность наночастиц.

В ИБФ СО РАН разработаны технологии, позволяющие получать из наноалмазов, производимых в России, модифицированные наноалмазы (МНА), которые обладают повышенной коллоидной устойчивостью в дисперсионных средах, адаптированы для медико-биологических исследований и не имеют мировых аналогов (Бондарь, Пузырь, 2004; Патент № 2252192, 2005; Puzyr et al., 2005; Puzyr et al., 2007). Частицы МНА: образуют устойчивые гидрозоли после простого добавления деионизованной воды к навеске порошка, что позволяет легко проводить их фракционирование по размерам кластеров с помощью центрифугирования при разных ускорениях; сохраняют коллоидную устойчивость после перевода частиц в сухое состояние и снова в золь, устойчивы при замораживании, автоклавировании, кипячении, пропускании переменного тока. Внешний вид порошков МНА, имеющих разные размеры кластеров наночастиц, и гидрозолей, полученные на основе этих наночастиц, представлены на Рисунках 1.5 (а) и 1.5 (б), соответственно.

Рисунок 1.5 (а) – Порошки МНА, имеющих размеры кластеров наночастиц: 4 – 200 нм (слева) и 150 – 600 нм (справа).

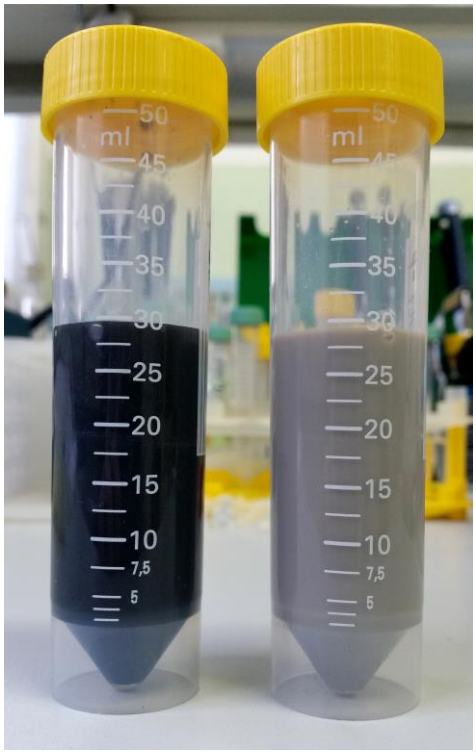


Рисунок 1.5 (б) – Внешний вид гидрозолей МНА с разными размерами кластеров наночастиц: 4 – 200 нм (слева) и 150 – 600 нм (справа).

Изображение частиц МНА, полученное с помощью растровой электронной микроскопии, представлено на Рисунке 1.5 (в).

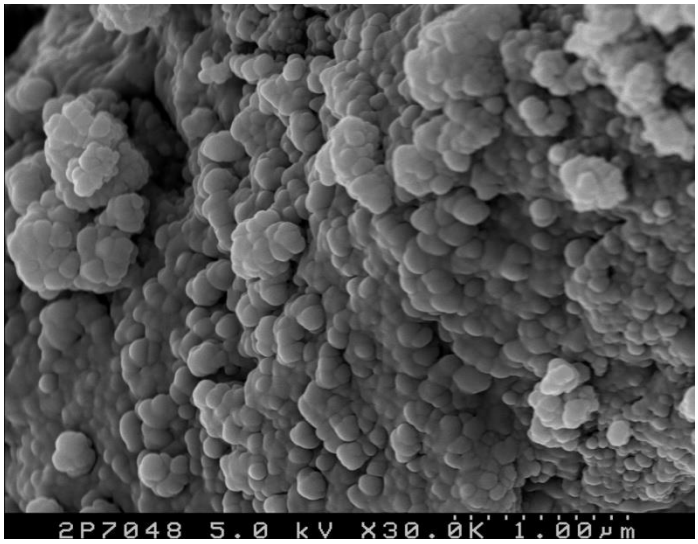


Рисунок 1.5 (в) – РЭМ изображение частиц МНА. Фотография любезно предоставлена Mr. Omori Masayoshi (Tokyo Progress System LTD).

Совершенно очевидно, что свойства МНА позволяют рассматривать их как весьма перспективный наноматериал биотехнологического назначения. Так, доказано, что МНА могут применяться в биотехнологии как полифункциональный адсорбент для экспресс-выделения и очистки целевых белков из рекомбинантных источников и природных объектов (Бондарь и др., 2008) и дополнительной очистки белковых препаратов, поставляемых коммерческими фирмами (Бондарь, Пузырь, 2005; Puzyr et al., 2007).

Не менее перспективным направлением применения МНА в биотехнологии является разработка на их основе новых средств индикации и диагностики (тест-системы, биочипы) и систем адресной доставки веществ (например, лекарственных препаратов пептидной и белковой природы), поскольку эти наночастицы могут стать новым альтернативным носителем для иммобилизации ферментов. Ранее было установлено, что ферменты, адсорбированные на наноалмазах, сохраняют свою каталитическую функцию (Пуртов и др., 2001; Пузырь и др., 2004). Это явилось предпосылкой для применения МНА в конструировании индикаторных систем (включая многокомпонентные), в которых сенсорным элементом является комплекс наночастицы – маркерный белок (белки) (Puzyr et al., 2007; Ронжин и др., 2010; Бондарь и др., 2008). Показана также принципиальная возможность использования МНА как основы (носителя) в конструировании систем адресной доставки веществ (Purtov et al., 2010; Пуртов и др., 2011).

1.6 Биолюминесцентное тестирование

Изучение явления и разработка способов использования бактериальной биолюминесценции является одним из широко применяемых направлений в микробиологии и микроанализе (Wegrzyn, Czyz, 2002; Scott et al., 2011). Диапазон практического использования явления бактериальной биолюминесценции очень широк. Биолюминесцентное тестирование используется при проведении экологичекого мониторинга для биотестирования загрязнения поверхностных

водоемов, промышленных стоков и почв (Belkin, 2003; Esimbekova et al., 2013; Esimbekova et al., 2014), фармацевтических исследований для определения степени токсичности вновь синтезированных химических соединений (Amante, Badr, 2014).

Ферментативные биолюминесцентные системы демонстрируют высокую чувствительность к действию токсических веществ – их чувствительность, по сравнению с бактериальными системами, часто бывает выше в 100 – 1000 раз. Это объясняется тем, что токсические вещества в ферментативных биотестах действуют непосредственно на люциферазу (ключевой фермент метаболизма светящихся бактерий), тогда как в случае бактерий они не могут оказывать прямого влияния на люциферазу из-за клеточных стенок и мембраны бактерий (в этом случае происходит влияние на другие важные процессы жизнедеятельности клетки связанные с биолюминесценцией, например, дыхание). Также отличительной особенностью ферментативных биотестов по сравнению с бактериальными является возможность варьировать их чувствительность, изменяя условия проведения анализа (количество ферментов и субстратов, объем добавляемой токсической смеси) (Кудряшева и др., 2002).

В разработке и создании методов биолюминесцентного микроанализа в качестве индикаторных белков (светоизлучающих маркеров) активно используют люциферазы морских светящихся бактерий (Кратасюк, Гительзон, 1987; Ронжин и др., 2008, Esimbekova et al., 2014).

Бактериальная люцифераза представляет собой гетеродимер (состоит из двух неидентичных α- и β- субъединиц), имеющий относительную молекулярную массу около 80 кДа (Гительзон, 1984). В структуру фермента в качестве кофактора входит флавин. Молекулярные массы субъединиц у ферментов из разных видов светящихся морских бактерий имеют различия и составляют диапазон 39 – 46 кДа и 33 – 42 кДа для α и β субъединиц соответственно (Гительзон, 1984; Бондарь, 1988).

Ферменты этой группы являются типичными флавинзависимыми монооксигеназами, катализирующими в присутствии кислорода и восстановленного ФМН-H_2 окисление длинноцепочечного алифатического альдегида до соответствующей жирной кислоты с образованием в ходе реакции молекул H_2O и ФМН и генерацией кванта света в видимой области спектра (Гительзон, 1984).

Светоизлучающие тест-системы, создаваемые на основе ферментов этой группы (Патент № 2252963, 2005; Esimbekova et al., 2013), находят свое применение в практических целях для тестирования самых разных соединений (ферменты, токсины, ксенобиотики и т.д.); в научных биохимических и биофизических исследованиях. Биолюминесцентные тесты, основанные на применении этих ферментов, отличаются высокой чувствительностью и простотой исполнения анализа (Кудряшева и др., 2002).

Принцип люциферазных биотестов – обнаружение токсических свойств тестируемых веществ и смесей по их влиянию на биолюминесцентные ферментативные реакции. В основе биолюминесцентных биотестов чаще всего лежит ингибирование люциферазы компонентами анализируемых смесей. Токсичность смеси определяют по изменению величины интенсивности биолюминесценции в присутствии пробы по сравнению с контролем.

Измерение биолюминесцентной активности бактериальной люциферазы может осуществляться в двух вариантах: в ходе проведения биферментной люминесцентной реакции НАД(Ф)Н : ФМН – оксидоредуктаза – люцифераза (Петушков и др., 1984) и в ходе проведения моноферментной реакции с помощью фотовосстановленного ФМН (Бондарь и др., 1988). В первом случае восстановление субстрата люциферазы (ФМН-H_2) происходит в ходе ферментативной реакции, катализируемой оксидоредуктазой за счет эквивалентов кофермента НАД(Ф)Н, во втором – за счет фотохимической реакции, индуцируемой воздействием прямого света на раствор субстрата в присутствии ЭДТА как донора электронов.

В данной работе применялась моноферментная реакция, которая заключается в ферментативном окислении фотовосстановленного ФМН-H_2 до ФМН и длинноцепочечного альдегида (RCHO) до миристиновой кислоты (RCOOH) в присутствии кислорода воздуха:

$$ФМН\text{-}H_2 + RCHO + O_2 \rightarrow \textit{Люцифераза} \rightarrow ФМН + RCOOH + H_2O + h\nu$$

При тестировании активности люциферазы в измерительную кювету прибора вносят необходимые компоненты реакционной смеси (буфер, альдегид и ферментный препарат), после чего осуществляют запуск реакции, впрыскивая ФМН-H_2. Биолюминесцентный сигнал, развивающийся в ходе реакции, регистрируют с помощью самописца. В случае использования фотовосстановленного ФМН содержание люциферазы определяют по начальной скорости реакции, которую оценивают по максимальной интенсивности биолюминесценции (Бондарь и др., 1988).

Однако при массовом проведении такого варианта биолюминесцентного анализа может наблюдаться большой расход фермента, который используют в реакционной смеси однократно.

Исходя из этого, одной из задач настоящей работы было изучить возможность создания биолюминесцентной тест-системы многоразового действия на основе наночастиц алмаза, люциферазы и органической полимерной матрицы. Целесообразность выбора фермента определялась широким спектром аналитических задач, которые позволяют решать биолюминесцентные методы, основанные на использовании светоизлучающих белков.

1.7 Ферментативные методы определения глюкозы и холестерина

Использование в клинической биохимии ферментативных методов анализа, обусловлено высокой чувствительностью и специфичностью ферментов, низкой температурой реакций, нетоксичной инкубационной средой (водная среда,

буферные системы). Также, преимуществом данных методов является то, что ферменты катализируют превращения веществ с большой скоростью и высоко избирательно, даже если анализируемое соединение находится в смеси с другими близкими по химическому строению веществами (Яковлева, 2005).

Ферментативные методы определения таких субстратов как глюкоза, холестерин, триглицериды, мочевина, креатинин, молочная кислота основаны на колориметрических реакциях с образованием цветных продуктов и являются абсорбционными, или спектрофотометрическими, методами.

По способу фотометрирования данные методы делятся на колориметрические методы и УФ методы (фотометрирование осуществляют при длине волны 340 нм). По участку кинетической кривой, на котором происходит фотометрирование, различают кинетические методы и методы по конечной точке (Рисунок 1.6) (Яковлева, 2005).

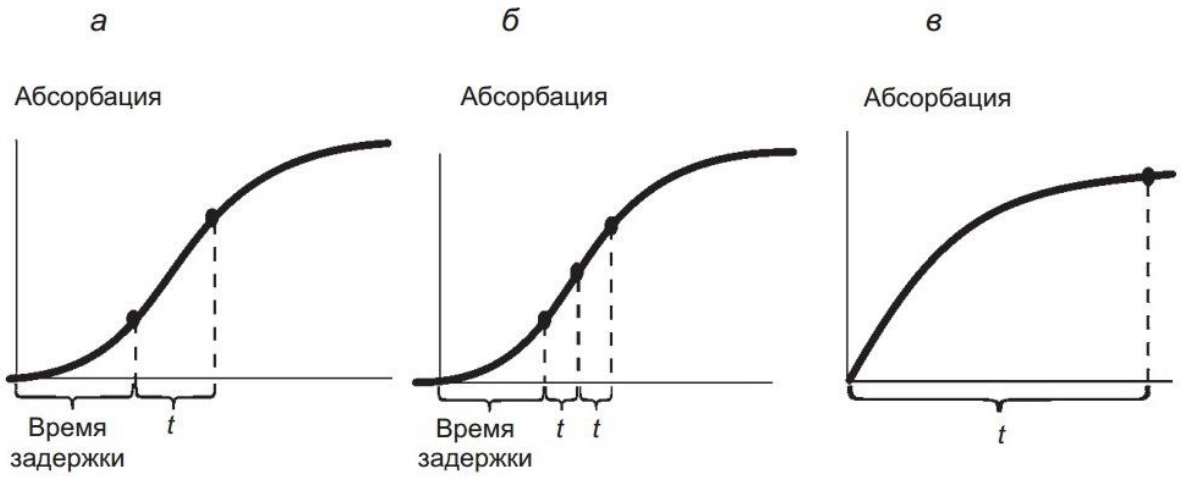


Рисунок 1.6 – Ферментативные методы определения субстратов (рисунок из (Яковлева, 2005)): а – двухточечная кинетика; б – многоточечная кинетика; в – по конечной точке.

В первом случае фотометрирование осуществляют на начальном линейном участке кинетической кривой (Рисунок 1.6 а, б), при этом скорость изменения оптической плотности реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации

аналита; во втором – когда кинетическая кривая выходит на плато (Рисунок 1.6 в), при этом оптическая плотность реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации аналита (Яковлева, 2005).

Наиболее многочисленной группой (по количеству определяемых веществ) являются колориметрические методы по конечной точке, суть которых заключается в следующем:

1. На первом этапе анализируемое вещество в ходе ферментативной реакции или цепи реакций трансформируется в продукт, который можно определить колориметрическим методом.

2. На втором этапе этот продукт взаимодействует с хромогенным комплексом, образуя окрашенное соединение, которое фотометрируют. Интенсивность его окраски пропорциональна концентрации аналита в биологической жидкости.

Например, уреаза превращает мочевину в аммиак, который при взаимодействии с салицилатом-Na и гипохлоритом-Na в присутствии нитропруссида-Na образует продукт зеленого цвета (Яковлева, 2005).

Липопротеинлипаза, глицеролкиназа, глицерофосфатоксидаза последовательно превращают триглицериды в перекись водорода, которая при взаимодействии с хромогенным комплексом в присутствии пероксидазы образует хинониминовый краситель малинового цвета (Яковлева, 2005).

Расчет концентрации аналита проводят относительно калибратора по формуле:

$$C = \frac{A_O - A_X}{A_K - A_X} \times C_K, \quad (1)$$

где C – концентрация аналита, A_O – оптическая плотность опытной пробы, A_K – оптическая плотность калибровочной пробы, A_X – оптическая плотность холостой пробы, C_K – концентрация калибратора.

Как правило, в качестве калибратора используют калибровочный раствор соответствующего аналита или промежуточного продукта каскада реакций (например глицерина при определении триглицеридов). Во всех методах, кроме метода определения мочевины, одним из конечных продуктов ферментативной реакции или реакций является перекись водорода, которая в присутствии фермента пероксидазы окисляет хромогенный комплекс, состоящий из 4-ААП (4-аминоантипирин), фенола (или 4-хлорфенола) и 3,5-ДХГБС (3,5-дихлор-2-гидроксибензолсульфонат) в различных комбинациях, в хинониминовый краситель малинового цвета, количество которого определяют фотометрически (Яковлева, 2005).

Гексокиназный метод определения глюкозы.

В данном методе глюкоза под действием гексокиназы (АТФ зависимая D гексоза 6-фосфотрансфераза, КФ 2.7.1.1) при участии АТФ превращается в глюкозо-6-фосфат (Г-6-Ф), который под действием глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназы (Г-6-ФДГ) превращается в 6-фосфоглюконо-d-лактон. Количество НАДН, образовавшегося в ходе сопряжённых реакций, пропорционально количеству глюкозы в среде инкубации и может быть определено по изменению поглощения длине волны 340 нм.

D-глюкоза + АТФ → *Гексокиназа* → Глюкозо-6-фосфат + АДФ

Глюкозо-6-фосфат + НАД+ → *Г-6-ФДГ* → 6-фосфоглюконат + НАДН

Несмотря на то, что ряд гексоз способны вступить в гексокиназную реакцию, их низкая концентрация в сыворотке крови не вызывает существенного вмешательства. Гексокиназный метод обычно не проводят в варианте кинетической процедуры из-за необходимости регистрации начальной скорости реакции.

Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью (Staroatina et al., 1994). Для данного метода пригодна сыворотка или плазма, полученная с использованием NaF, ЭДТУК, гепарина, оксалата или цитрата. Многие лекарственные препараты, билирубин, триглицериды в концентрации выше 500 мг/100 мл способствуют завышению результатов. Фруктоза способна помешать определению глюкозы, однако, в сыворотке крови натощак ее концентрация низкая. Величину поглощения образца или калибровочного раствора измеряют после завершения реакции. Концентрацию глюкозы можно рассчитать, исходя из значения коэффициента молярного поглощения НАДФH_2 или НАДH_2. Предпочтительнее использовать калибровочные растворы с известным содержанием глюкозы. Линейная зависимость между поглощением и концентрацией глюкозы сохраняется до 27,7 ммоль/л (Allen et al., 1990).

В некоторых автоматизированных системах (Continuous flow analysis system) использовали иммобилизированную гексокиназу и Г-6-ФДГ, что значительно снижало затраты на определение (Fontbonne et al., 1989).

Глюкозооксидазный/пероксидазный метод.

В настоящее время наиболее широко используется глюкозооксидазный метод, основанный на использовании ферментов глюкозооксидазы и пероксидазы. Продукт активности пероксидазы хрена представляет собой цветное или люминесцентное соединение, подходящее для детекции и количественного анализа.

Глюкозооксидаза катализирует перенос двух водородных атомов с первого углеродного атома глюкозы на кислород, растворенный в жидком реагенте. При этом в ходе реакции образуется в эквимолярных количествах перекись водорода – концентрация образовавшейся перекиси водорода точно равна определяемой концентрации глюкозы. Следовательно, использование глюкозооксидазной реакции трансформировало задачу определения концентрации глюкозы в задачу определения концентрации перекиси водорода.

Пероксидаза в присутствии перекиси водорода окисляет хромогенный краситель, что приводит к образованию окрашенного продукта, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию глюкозы в среде инкубации:

D-глюкоза + O_2 + H_2O → *Глюкозооксидаза* → Глюконовая к-та + H_2O_2

$2H_2O_2$+ фенол + 4-ААП → *Пероксидаза* → Хинонимин + $4H_2O$

Глюкозооксидазный метод признан сегодня одним из самых точных количественных методов определения глюкозы. Уникальную специфичность глюкозооксидазной реакции использовали для создания автоматизированных методов определения глюкозы с высокой специфичностью и точностью. Эти процедуры основаны на регистрации потребления кислорода при помощи кислородного электрода в процессе окисления глюкозы после добавления образца к раствору, содержащему глюкозооксидазу (Schneider et al., 1992). Поскольку измерение убыли кислорода относится только к первой реакции, определение становится более специфичным по отношению к глюкозе, так как исключается вторая менее специфичная стадия реакции при участии пероксидазы.

Холестериноксидазный/пероксидазный метод.

Принцип данного метода идентичен глюкозоокидазному методу определения глюкозы и для проведения реакции используются те же реагенты. Отличие заключается в том, что образование хинониминового красителя происходит в результате трёх последовательных сопряжённых реакций, каждую из которых катализирует определенный фермент:

Эфир холестерина + O_2 → *Холестеринэстераза* → Холестерин (1)

Холестерин + O_2 → *Холестериноксидаза* → Холестенон + H_2O_2 (2)

$2H_2O_2$ + Фенол + 4-ААП → *Пероксидаза* → Хинонимин + $4H_2O$ (3)

При гидролизе эфиров холестерина холестеринэстеразой образуется свободный холестерин. Образовавшийся и имеющийся в пробе холестерин окисляется кислородом воздуха под действием холестериноксидазы с образованием эквимолярного количества перекиси водорода. Под действием пероксидазы перекись водорода окисляет хромогенные субстраты с образованием окрашенного соединения (хинонимина), интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации холестерина в пробе.

Холестериноксидазный метод является одним из самых точных количественных методов определения общего холестерина в настоящее время. Поскольку определение общего холестерина включает определение «свободного» и «связанного» холестерина. В сыворотке (или плазме) крови около 20 % холестерина находится в эстерифицированной форме. Это имеет существенное значение, поскольку в некоторых химических реакциях интенсивность окраски эфиров холестерина более интенсивная, чем у свободного холестерина, что в свою очередь может привести к аналитической ошибке. В некоторых ферментативных реакциях неполный гидролиз длинноцепочечных эфиров холестерина, в частности с арахидоновой кислотой, может приводить к занижению результатов (Werner et al., 1979).

ГЛАВА 2 Материалы и методы

2.1 Материалы и реагенты

В работе использовали МНА марок RUDDM 0-125 (d_{50} = 49.6 нм) и RUDDM 200-500 (d_{50} = 270 нм), производимые ООО «Реал-Дзержинск» (Россия) по технологии, разработанной в ИБФ СО РАН (Бондарь, Пузырь, 2004; Патент № 2252192, 2005) и обладающие высокой коллоидной стабильностью в дисперсионных средах. В экспериментах применяли гидрозоли МНА с концентрацией наночастиц 10.0 г/л, которые готовили добавлением деионизованной воды к навеске порошка МНА. Деионизованную воду получали с помощью системы Milli-Q system (Millipore, США).

Для создания индикаторной биолюминесцентной системы в работе использовали белковый экстракт с активностью $800 \cdot 10^3$ отн. ед. на 1 мкл, содержащий светоизлучающий фермент люциферазу, полученный из бактериальных клеток *E. coli* рекомбинантного штамма-продуцента Z905, содержащих плазмиду pPHL7 с генами бактериальной люминесцентной системы Ph. leiognathi (Патент № 2073714, 1997). Для получения экстракта замороженную клеточную биомассу ресуспендировали в 5 мМ Трис-HCl буфере (pH 7,0), включающем 5 мМ ЭДТА. Клетки разрушали, обрабатывая полученную суспензию ультразвуком на ледяной бане (режим обработки: мощность 22 кГц, 2 раза по 15 секунд с перерывом 1 минута). Клеточные обломки удаляли центрифугированием в течение 15 минут при 13200 об/мин при 4 °С, полученный супернатант использовали в работе.

Также для исследований применяли препарат высокоочищенной люциферазы с активностью $70 \cdot 10^3$ отн. ед. на 1 мкл, выделенный с помощью наноалмазов объемным методом из экстрактов бактериальных клеток *E. coli* (Ронжин и др., 2008). Для выделения люциферазы использовали культуру клеток *E. coli* (штамм Z905 из коллекции ИБФ СО РАН), содержащих плазмиду PHL7

(luxCDABE, ampR) с генами бактериальной люминесцентной системы Ph. leiognathi (Патент № 2073714, 1997).

Активность фермента тестировали с помощью фотовосстановленного ФМН. Реакционная смесь включала: 450 мкл 20 мМ K/Na фосфатного буфера (pH 7,0); 50 мкл $4{,}7 \cdot 10^{-6}$ М тетрадеканаля (C_{14}-альдегида); 1 – 5 мкл исследуемого образца (люцифераза, комплекс наноалмаз-люцифераза) или люминесцентную тест-систему с комплексом наноалмаз-люцифераза. Реакцию запускали, инжектируя в кювету 500 мкл $7{,}8 \cdot 10^{-5}$ М фотовосстановленного ФМН.

Температурную обработку люциферазы в используемом экстракте, в высокоочищенном виде и в составе индикаторных комплексов проводили с помощью термостата «ТВ-85 Thermo Batch» (Shimadzu, Япония).

Для создания тест-систем биохимической диагностики использовали: растворы ферментов из наборов Холестерин-Витал (Витал Диагностик, С.-Петербург, Россия) и Glucose LS (ProDia International, Germany), применяемых для определения концентрации общего холестерина и глюкозы соответственно, в сыворотке и плазме крови; сухие препараты чистых ферментов: глюкозооксидаза из Aspergillus niger (ООО ИМПАКТ®, Россия) и пероксидаза из корней хрена (Sigma, США). Для экспериментов ферментные растворы предварительно диализовали против 10 мМ фосфатного буфера (pH 7.0) ультрафильтрацией (система Amicon, USA) через мембрану с пределом исключения 30 кДа.

В исследованиях использованы реагенты: 4-аминоантипирин (1-фенил-2,3-диметил-4-аминопиразолон) (4-ААП) и β-D-глюкоза (Реахим, Россия), фенол (Flucka, Germany), калибратор холестерина (Витал Диагностик, С.-Петербург, Россия), буферные растворы: фосфатный, бис-трис пропановый, трисовый, натрий ацетатный, аммоний ацетатный (Sigma, США). Рабочие растворы реагентов готовили *in situ* в деионизованной воде.

2.2 Функционализация поверхности МНА

С целью ковалентной иммобилизации ферментов на частицы МНА, поверхность наноалмазов предварительно функционализировали (активировали) с помощью бензохинона по известной методике (Brandt et al., 1975; Mateescu et al., 1989; Purtov et al., 2011), позволяющей проводить иммобилизацию белков на активированном носителе в относительно мягких условиях. Данный методический прием используется в тех случаях, когда поверхность носителя содержит ОН группы. Поскольку ранее на поверхности МНА данный тип функциональных групп был выявлен (Gibson et al., 2009), мы использовали указанную технологию для активации.

Функционализацию МНА проводили следующим образом. Реакционная смесь суммарным объемом 10 мл, приготовленная на деионизованной воде, содержала: 20 мМ фосфатный буфер (pH 8.0), МНА (финальная концентрация наночастиц 1 масс. %), 20 %-ный этанол, 300 мг гидрохинона, приготовленного на 20%-ном водном этаноле. При этом известно, что при слабощелочных условиях среды (pH 7.5 – 8.0) гидрохинон окисляется с образованием бензохинона (Остерман, 1985). Полученную суспензию инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов при постоянном перемешивании со скоростью 150 об/мин на шейкере OS-10 (BIOSAN, Латвия). После этого функционализированные МНА собирали центрифугированием при ускорении 16000g на центрифуге Eppendorf centrifuge 5415R (Eppendorf, Германия) в течение 10 мин при температуре 10 °С. Полученный осадок наночастиц промывали до полного удаления не связавшихся реагентов по следующей схеме: дважды 20 %-м водным этанолом, один раз 1 М раствором NaCl, трижды деионизованной водой. При этом каждый раз осадок МНА ресуспендировали в объеме промывочного раствора и собирали наночастицы центрифугированием при указанных выше условиях. Отмытые МНА ресуспендировали в деионизованной воде и использовали их для ковалентной пришивки ферментов.

2.3 Адсорбция люциферазы на частицы МНА

Адсорбцию светоизлучающего белка люциферазы на поверхность частиц МНА осуществляли несколькими способами.

В первом, комплекс МНА-люцифераза получали добавлением гидрозоля МНА к раствору высокоочищенного белка в соотношении 1 : 1 (объем : объем), осаждением кластеров МНА с адсорбированным белком центрифугированием, промывкой осадка элюирующим буфером от не адсорбированного белка и переводом комплекса МНА–люцифераза в состояние гидрозоля, ресуспендируя отмытый осадок в деионизированной воде.

Также получение комплекса МНА–люцифераза осуществляли в процессе выделения рекомбинантной люциферазы из экстрактов бактериальных клеток *E. coli* с помощью наноалмазов в объёме (*in batch*). Схема выделения и очистки люциферазы в объеме, оптимизированная в ходе предварительных экспериментов, включала следующие стадии. К исходному белковому экстракту, содержащему 5 % D-глюкозу, добавляли гидрозоль МНА в соотношении 1 : 1 (объем : объем) и после перемешивания суспензии собирали наночастицы с адсорбированным белком центрифугированием при ускорении 16000 g в течение 5 минут при 4 °С. Для более полного осаждения частиц перед центрифугированием в суспензию добавляли хлорид натрия до концентрации 100 – 120 мМ. Полученный осадок дважды отмывали раствором 5 % D-глюкозы, содержащим 5 мМ ЭДТА, каждый раз ресуспендируя в нем наночастицы и собирая их центрифугированием при указанных выше условиях. Перед центрифугированием в образцы каждый раз добавляли хлорид натрия в концентрации, указанной выше, для более полного осаждения наночастиц. Завершающим этапом являлась последовательная десорбция (элюция) люциферазы с поверхности наночастиц 50 мМ K/Na фосфатным буфером (pH 7.0), содержащим 5 мМ ЭДТА и 5 % D-глюкозу. Конечный осадок, содержащий комплекс МНА-люцифераза, ресуспендировали в растворе 5 % D-глюкозы и использовали в работе.

Комплекс МНА – брушит (Са-фосфат) – люцифераза получали следующим способом. К гидрозолю МНА при постоянном перемешивании одновременно добавляли в равных объемах эквимолярные растворы хлористого кальция и фосфатного буфера для образования комплекса МНА-брушит, в котором частицы наноалмаза выполняли функцию зародышевых центров. После этого, частицы полученного комплекса МНА-брушит осаждали центрифугированием и дважды отмывали водой, каждый раз ресуспендируя их и собирая центрифугированием. К отмытому ресуспендированному осадку МНА-брушит добавляли раствор белка. Частицы с адсорбированным белком собирали центрифугированием, полученный осадок промывали для удаления примесей не адсорбированного белка. Полученный комплекс переводили в состояние гидрозоля и использовали в экспериментах.

2.4 Конструирование биолюминесцентной тест-системы

Известно, что сорбенты на основе полисахаридов (агарозные, декстрановые) неустойчивы при высоких температурах и это является ограничением по их применению в хроматографии (Остерман, 1985). Это свойство использовали в целях конструирования тест-системы. Было исследовано, как ведут себя такие гели при их плавлении и застывании, а также какова их адгезия на подложках – стеклянных стержнях с наружным диаметром 1,5 мм. Гранулы сорбентов помещали в термоустойчивые пробирки и инкубировали на кипящей водяной бане (температура около 100 °С). После расплавления сорбента полученный жидкий гель наносили на подложку с помощью обмакивания стеклянного стержня в гель. Конструкция создаваемой тест-системы в виде стеклянного стержня была выбрана из-за технических особенностей люминометра БЛМ 8801.

Конструирование индикаторной тест-системы на основе полимерной матрицы, МНА и люциферазы проводили по следующей схеме. На стеклянную подложку наносили жидкий гель полимерной матрицы, предварительно промытый в 5 % D-глюкозе. Для более быстрого и качественного высушивания

геля на подложке ее помещали в ацетон, который «экстрагировал» часть воды из геля. Для последующего полного высушивания геля подложку оставляли на воздухе при комнатной температуре на 2 – 3 суток. На завершающей стадии стеклянную подложку с фиксированной матрицей помещали на 15 мин в суспензию комплека МНА-люцифераза (индикаторный комплекс) в 5 % D-глюкозе.

Конструирование индикаторной тест-системы на основе полимерной матрицы, брушита и люциферазы проводили по следующей схеме. Фосфат кальция получали при смешивании эквимолярных растворов хлористого кальция и K/Na фосфатного буфера в соотношении 1 : 1 (объем : объем). Образовавшиеся нерастворимые хлопья брушита осаждали центрифугированием при малых оборотах, после чего отбирали супернатант и добавляли к осадку брушита водный раствор 5 % D-глюкозы. Полученный образец суспензии частиц брушита в 5 % D-глюкозе смешивали в соотношении 1:1 (объем : объем) с сефарозой (также находящейся в 5 % D-глюкозе). Полученную смесь плавили в термостате до образования жидкого геля и наносили на стеклянную подложку, помещая её в расплавленную смесь. После высушивания нанесенной смеси подложку помещали на 15 минут в исходный белковый экстракт для иммобилизации люциферазы в матрицу. После всего, тест-систему промывали в деионизованной воде для удаления не адсорбированных молекул фермента после чего использовали для экспериментов.

Конструирование тест-системы с индикаторным элементом МНА-брушит-люцифераза проводили по следующей схеме. Комплекс МНА-брушит получали добавлением к гидрозолю МНА при постоянном перемешивании в равных объемах эквимолярных растворов $CaCl_2$ и K/Na фосфатного буфера. При этом частицы наноалмаза выполняли функцию зародышевых центров. К отмытому и ресуспендированному в воде осадку МНА-брушит добавляли раствор исходного белкового экстракта, содержащий люциферазу. МНА с адсорбированным белком осаждали центрифугированием, полученный осадок промывали для удаления

примесей не адсорбированного белка и ресуспендировали в воде. Для иммобилизации комплекса МНА-брушит-люцифераза, в полученную суспензию на 15 минут помещали стеклянную подложку с предварительно нанесенной сефарозой и иммобилизовали комплекс.

2.5 Ковалентная иммобилизация ферментов на частицы МНА

Для ковалентной иммобилизации ферментов на частицы МНА ферментный препарат из наборов диализовали против 10 мМ фосфатного буфера (pH 7.0) для удаления низкомолекулярных компонентов, имеющихся в растворе (фенол, 4-ААП, консерванты). Диализ проводили с помощью системы ультрафильтрации (Amicon, США), используя мембрану с пределом исключения 30 кДа. После трехкратной замены буфера в препарате его использовали в работе.

В работе использовали также чистые препараты ферментов: глюкозооксидазу из низших грибов Aspergillus niger в виде сухого препарата ООО ИМПАКТ® (Россия); пероксидазу из корней хрена в виде сухого препарата фирмы Sigma (США). Растворы на основе чистых ферментов готовили in situ в деионизованной воде и использовали для иммобилизации. При работе с растворами чистых ферментов предварительно готовили смеси глюкозооксидазы и пероксидазы с разными весовыми соотношениями белков: 1 : 9, 1 : 3, 1 : 1, 3 : 1 и 9 : 1, соответственно. Эти исследования были направлены на изучение эффективности биферментного комплекса глюкозооксидаза-МНА-пероксидаза, получаемого при использовании разных весовых соотношений ферментов на стадии их ковалентной иммоблизации на наночастицы.

Одновременную ковалентную иммобилизацию ферментов на активированные бензохиноном наночастицы проводили в 50 mM Na-бикарбонатном буфере (pH 8.0). Для этого растворы ферментов смешивали с гидрозолем активированных МНА. Полученную суспензию при постоянном перемешивании инкубировали в течение 1 – 2 часов при комнатной температуре с постоянным перемешиванием на шейкере OS-10 со скоростью 150 об/мин. После

этого, МНА с иммобилизованными ферментами собирали центрифугированием при 16000 g на центрифуге Centrifuge 5415R в течение 10 мин при температуре 10 °С. Супернатант отбирали для оценки не иммобилизовавшегося количества белка. Полученный осадок трижды промывали раствором 0.25 М NaCl для удаления остатков слабо связавшихся и неспецифически адсорбированных с поверхностью МНА ферментов, каждый раз ресуспендируя наночастицы в объеме промывочного раствора и собирая их центрифугированием при указанных выше условиях. Супернатанты каждый раз отбирали для анализа количества белка. Отмытый осадок МНА с ковалентно иммобилизованными ферментами ресуспендировали в деионизованной воде и использовали для экспериментов.

2.6 Определение емкости МНА при иммобилизации ферментов

Оценку емкости МНА при одновременной ковалентной иммобилизации ферментов проводили по количеству белка, химически пришитого на единицу носителя. Концентрацию белка в образцах измеряли методом микроопределения с биуретовым реактивом (Кочетов, 1981), используя БСА в качестве стандарта. Для расчетов концентрации белка использовали величину оптической плотности образцов при 330 нм, которую оценивали с помощью UV/VIS спектрофотометра UV-2600 (Shimadzu, Japan). В ряде случаев, определение белка в препаратах проводили спектрофотометрически по величине оптической плотности при 280 нм, для расчетов использовали калибровочную зависимость величины оптической плотности от концентрации БСА в растворе.

Расчеты емкости (мг белка / мг МНА) проводили из результатов определения концентрации белка: в исходных растворах ферментов; в супернатантах, полученных после проведения процесса их иммобилизации на МНА и удаления наночастиц центрифугированием; в промывочных растворах на стадиях отмывки МНА от слабо связавшихся и неспецифически адсорбированных белков.

2.7 Оценка активности комплексов МНА-ферменты

Активность полученных комплексов МНА–иммобилизованные ферменты оценивали реакцией окислительного азосочетания (H_2O_2 – 4-аминоантипирин – фенол) (Еремин и др., 2006). В ее основе лежит образование окрашенного соединения в реакции между фенолом и 4-ААП при участии перекиси водорода. Реакция катализируется пероксидазой в присутствии H_2O_2 и сопровождается образованием окрашенного продукта реакции (хинонимин), что нашло широкое применение в медицинской диагностике для ферментативного определения физиологически важных веществ (Kepry et al., 2009).

При этом определение глюкозы обеспечивается двумя последовательными биохимическими реакциями:

D-глюкоза + O_2 + H_2O → *Глюкозооксидаза* → Глюконовая к-та + H_2O_2

$2H_2O_2$+ Фенол + 4-ААП → *Пероксидаза* → Хинонимин + $4H_2O$

Определение холестерина включает три последовательных биохимических реакции:

Эфир холестерина → *Холестеринэстераза* → Холестерин

Холестерин + O_2 → *Холестериноксидаза* → Холестенон + H_2O_2

$2H_2O_2$ + Фенол + 4-ААП → *Пероксидаза* → Хинонимин + $4H_2O$

Образование окрашенного продукта регистрируется спектрофотометрически по величине оптической плотности при длине волны 506 нм.

При тестировании активности комплексов МНА-ферменты конечная концентрация ингредиентов в объеме реакционной смеси 1 мл составляла: 0,56 мг/мл фенола; 0,10 мг/мл 4-ААП и 1 мг/мл глюкозы или холестерина. Используемые концентрации фенола и 4-ААП соответствовали концентрациям, применяемым фирмой «ProDia International» (Германия) в наборах для определения глюкозы и холестерина и были стандартными при всех измерениях.

Контрольными являлись образцы реакционной смеси, не содержащие комплексы МНА-ферменты, опытными – образцы в качестве катализатора реакции содержали комплексы МНА-ферменты с концентрацией наночастиц 0,05 масс. %. После запуска реакции добавлением в реакционную смесь анализируемого вещества (глюкозы или холестерина – финальная концентрация 1 мг/мл) образцы интенсивно перемешивали в течение 3 – 5 секунд на Vortex-Genie 2 g-560E (Scientific Industries, Inc., USA) и инкубировали. Время и температура инкубации варьировалась в зависимости от проводимого эксперимента.

По завершении эксперимента комплексы МНА-ферменты из опытных образцов удаляли центрифугированием при 16100 g в течение 10 минут при температуре 10 °С. Полученные супернатанты отбирали и проводили спектрофотометрическую оценку образования продукта реакции (UV/VIS спектрофотометр UVIKON 943) по величине оптической плотности на длине волны 506 нм.

2.8 Динамика образования продукта реакции окислительного азосочетания

При изучении динамики образования продукта реакции, катализируемой комплексом МНА–ферменты, использовали комплекс, полученный посредством ковалентной иммобилизации глюкозооксидазы и пероксидазы из раствора Glucose LS (ProDia International, Германия). При этом суммарное количество белка (иммобилизованные ферменты), вносимое с комплексом в реакционную смесь объемом 1 мл, составляло около 8 мкг. Для сравнения, аналогичным образом исследовали динамику образования продукта реакции, катализируемой свободными ферментами из раствора Glucose LS – суммарное количество белка (свободные ферменты) в реакционной смеси было аналогичным – 8 мкг.

В обоих случаях, реакционную смесь, содержащую перечисленные выше ингредиенты, вносили в измерительную кювету спектрофотометра. После добавления в реакционную смесь глюкозы, образцы интенсивно перемешивали в течение 3 – 5 секунд, кювету помещали в спектрофотометр и с определенным

интервалом времени регистрировали изменения величины оптической плотности при длине волны 506 нм.

2.9 Многократное использование комплексов МНА-ферменты

Оценку возможности многократного использования комплексов МНА–иммобилизованные ферменты для определения глюкозы и холестерина проводили по следующей схеме (Рисунок 2.1).

Рисунок 2.1 – Схема многоразового использования комплексов МНА–иммобилизованные ферменты для определения глюкозы и холестерина.

В реакционную смесь вносили необходимые ингредиенты (см. выше) и инкубировали полученную суспензию в течение 5 – 20 минут при комнатной температуре. После проведения реакции комплекс МНА–ферменты собирали центрифугированием и полученный супернатант отбирали для спектрофотометрического анализа образованного продукта при длине волны 506 нм. Осадок наночастиц дважды промывали раствором 0,25 М NaCl (или 20 мМ фосфатным буфером (pH 7.0)) для удаления остатков продукта и ингредиентов реакции, каждый раз ресуспендируя наночастицы в объеме промывочного раствора и собирая их центрифугированием. Отмытый комплекс

МНА–ферменты ресуспендировали в деионизованной воде и добавкой необходимых ингредиентов снова запускали реакцию.

2.10 Оценка активности комплексов МНА-ферменты в зависимости от физико-химических параметров среды

С целью оптимизации работы комплексов были проведены эксперименты, направленные на изучение влияния на их функциональную активность физико-химических параметров реакционной среды (состав буферной системы, pH и температура среды).

Оценку эффективности работы комплексов в зависимости от pH среды проводили с использованием серии 20 мМ фосфатного и бис-трис-пропанового буферов, имеющих значения pH в диапазоне 6.0 – 9.0.

Воздействие состава реакционной среды на активность комплексов МНА–ферменты изучали по уровню катализируемого им образования продукта в разных буферных системах, имеющих нейтральное значение pH. Для этих целей использовали серию буферов с концентрацией 20 мМ: фосфатный, аммоний-ацетатный, трисовый, натрий-ацетатный, бис-трис-пропановый. В качестве сравнения использовали растворы свободных ферментов.

При изучении эффективности работы комплексов МНА-ферменты в зависимости от температуры реакцию проводили в деионизованной воде в диапазоне температур от 20 °C до 60 °C, инкубируя образцы при различных температурах в термостате TB-85 Thermo Bath (Shimadzu, Japan).

Во всех перечисленных выше вариантах реакцию проводили в течение 5 – 20 минут, после чего комплексы МНА–ферменты удаляли из образцов центрифугированием, полученные супернатанты отбирали и проводили в них оценку количества образованного продукта.

2.11 Оценка образования продукта реакции, катализируемой комплексами МНА-ферменты, в зависимости от концентрации анализируемого вещества

Поскольку с практической точки зрения важным критерием оценки эффективности конструируемой тест-системы является диапазон концентраций выявляемого с ее помощью вещества, была проведена оценка выхода продукта реакции, катализируемой комплексами МНА – ферменты, в зависимости от концентрации глюкозы и холестерина. При этом диапазон концентраций глюкозы, задаваемый в реакционной смеси, составлял от 0.01 до 1.5 мг/мл, а диапазон концентрации холестерина составлял от 0.01 до 0.2 мг/мл. Данные интервалы концентрации аналитов позволяют осуществлять определение концентраций глюкозы и холестерина в пределах их физиологической нормы в крови человека. Инкубацию образцов проводили в течение 10 – 20 минут при комнатной температуре, после чего комплекс МНА-ферменты удаляли центрифугированием и проводили спектрофотометрический анализ количества образованного продукта в полученных супернатантах. Полученные данные использовали в построении калибровочного графика, используемого в последующих экспериментах по определению концентрации глюкозы и холестерина в сыворотки крови *in vitro* с помощью сконструированных биохимических тест-систем на основе частиц МНА и ковалентно иммобилизованных ферментов.

2.12 Определение концентраций глюкозы и холестерина в сыворотке крови человека *in vitro*

Оценку практической применимости сконструированных систем биохимической диагностики проводили в сравнительных экспериментах определения концентрации глюкозы и общего холестерина в образцах сыворотки крови человека *in vitro* с помощью комплексов МНА-ферменты и полифункционального автоматизированного биохимического анализатора Sapphire 400 (Niigata Mechatronics, Japan). Концентрацию глюкозы и холестерина с использованием комплексов МНА-ферменты определяли по количеству

образующегося окрашенного продукта реакции, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации аналита в пробе. Найденные значения концентраций определяемых веществ в образцах сравнивали со значениями, которые были получены в этих же образцах на биохимическом анализаторе.

2.13 Измерение интенсивности свечения люциферазы

Для измерения биолюминесцентной активности люциферазы использовали люминометр (модель БЛМ 8801) производства СКТБ «Наука» (Красноярск, Россия), калиброванного по радиоактивному стандарту Гастингса-Вебера (Hastings, Weber, 1963). Одна люминесцентная единица составляла 10^8 фотонов в 1 секунду. Люминесцентные сигналы регистрировали с помощью самописца (модель 2210) фирмы «LKB» (Швеция).

2.14 Определение элементного состава МНА

Для определения количества примесей ионов металлов в образцах МНА, имеющих разные размеры кластеров, проводили элементный анализ наночастиц на электронном микроскопе TM-1000 (Hitachi, Япония), оснащенным детектором TM1000 EDS, предназначенным для определения химического состава образца. Химический состав определяется путем измерения энергии рентгеновского излучения, возникающего при взаимодействии электронного пучка с поверхностью образца.

ГЛАВА 3 Исследование каталитической функции МНА в реакции окислительного азосочетания

3.1 Реакция окислительного азосочетания, катализируемая частицами МНА

Высокоразвитая химически активная поверхность наноалмазов детонационного синтеза (Чиганова, 1994; Gibson et al., 2009), обусловленная большим содержанием различных функционально активных групп, углеводородных фрагментов и микропримесей металлов, позволяет прогнозировать перспективность применения этого наноматериала в качестве катализатора. Было установлено, что МНА взрывного синтеза обладают каталитической активностью в реакции взаимодействия органических соединений, что открывает возможности использования этих наночастиц в создании новых систем индикации. Для исследований была выбрана реакция сопряженного окисления фенолов и их производных с 4-аминоантипирином (4-ААП) в присутствии гексацианоферрата (III) $K_3[Fe(CN)_6]$ или при pH $10 \pm 0{,}2$ (Лурье и др., 1984), составляющая основу фотометрического метода определения загрязнений среды фенолами и их производными (Белоусова и др., 2006; Еремина и др., 2004). Известно, что реакция окислительного азосочетания, или реакция Триндера, (перекись водорода – 4-ААП – фенол) стимулируется биокатализаторами пероксидазами (Еремин и др., 2006) с образованием окрашенного комплекса (максимум поглощения 480 – 520 нм). Данная реакция является наиболее распространенной системой индикации многих биохимических соединений и используется в большинстве современных методов анализа. Так, реакция Триндера широко применяется в медицинской диагностике для определения физиологически важных веществ (например, таких как глюкоза, холестерин, триглицериды), а также в экологическом мониторинге загрязнения окружающей среды фенолом и его производными (Kepply et al., 2009).

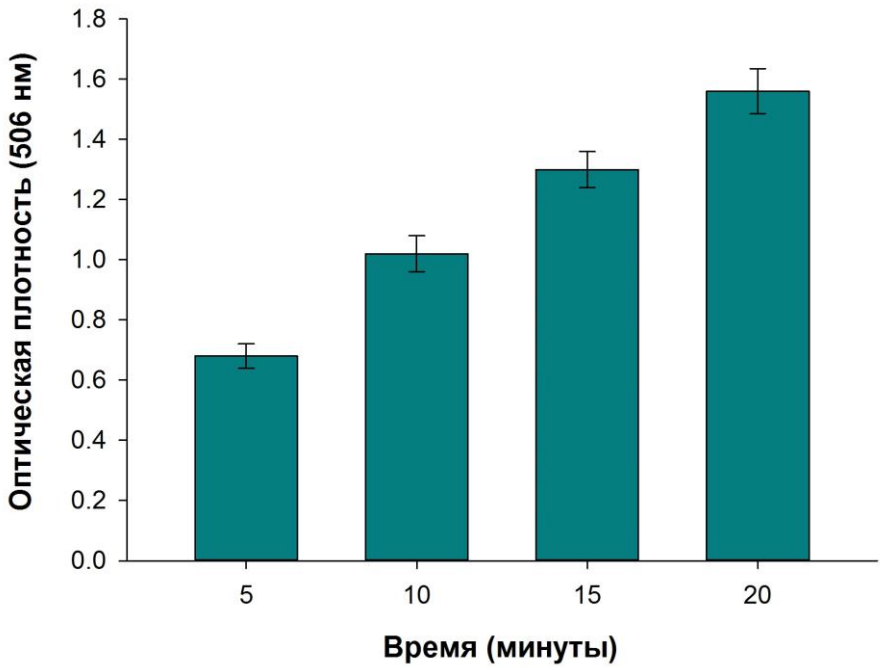


Рисунок 3.1 – Зависимость образования продукта реакции перекись водорода – 4-ААП – фенол от времени инкубации образцов при 20 °С с МНА.

При выбранных условиях эксперимента скорость реакции имеет практически линейный характер в диапазоне времени от 5 до 20 минут (Рисунок 3.1). В тех же условиях инкубации без добавки катализатора реакция протекает значительно медленнее и образования продукта не наблюдается как при 20 °С, так и при 40 °С. Оптическая плотность контрольных образцов (реакций без добавления МНА) составляет не более 0,2 – 0,3 % от оптической плотности опытных образцов.

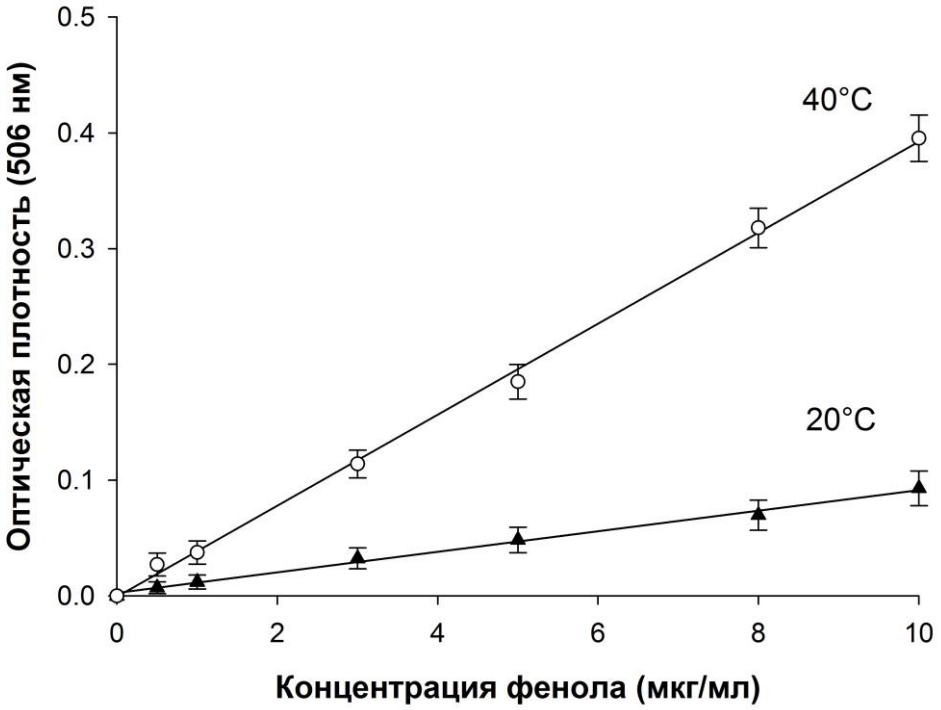


Рисунок 3.2 – Образование продукта реакции, катализируемое частицами МНА, в зависимости от концентрации фенола (инкубация образцов 10 мин).

Было установлено, что возрастание оптической плотности, вследствие образования продукта реакции, имеет линейный характер при концентрациях фенола в диапазоне 0 – 10 мкг/мл (Рисунок 3.2). Такая зависимость наблюдается при температурах 20 °C и 40 °C, с той разницей, что при температуре 40 °C (Рисунок 3.2) значения оптической плотности выше примерно в 4 раза по сравнению со значениями оптической плотности при 20 °C.

3.2 Участие поверхностных микропримесей металлов в каталитической активности МНА

Вследствие выявления факта каталитической активности частиц МНА, было сделано предположение, что каталитическая активность МНА в реакции окислительного азосочетания может быть опосредована наличием примесей ионов металлов, которые обнаруживаются на поверхности наночастиц (Бондарь, Пузырь, 2004; Puzyr et al., 2005).

Исходя из данного предположения, было исследовано, какие ионы металлов способны катализировать реакцию окислительного азосочетания H_2O_2 – 4-ААП – фенол. Для этого были выбраны ионы металлов, примеси которых выявляются на поверхности МНА (Бондарь, Пузырь, 2004; Puzyr et al., 2005): одновалентные ионы Na; двухвалентные ионы первой переходной серии (Mn, Fe, Co, Ni, Cu); двухвалентные ионы Mg, Ca, Cd и Zn; трехвалентные ионы Al.

В результате экспериментов было установлено (Рисунок 3.3), что в водной среде реакцию окислительного азосочетания способны катализировать только ионы железа и меди, относящиеся к первой переходной серии. Остальные ионы первой переходной серии: Mn, Co и Ni таким свойством не обладают – динамика образования продукта в присутствие этих ионов практически совпадает с контролем (без катализатора) (Рисунок 3.3).

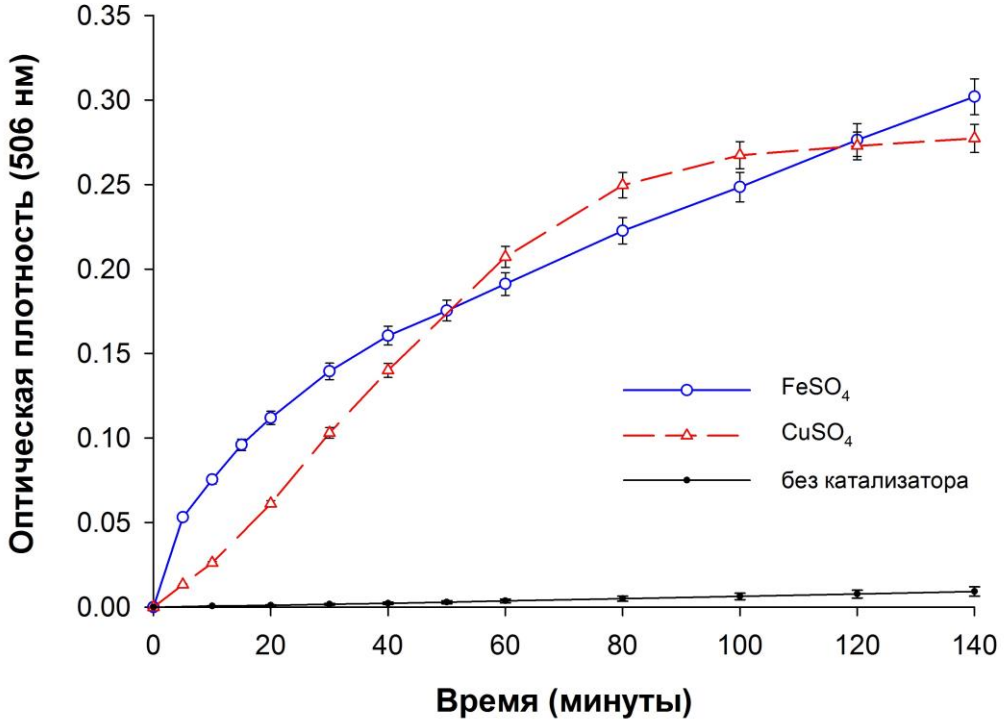


Рисунок 3.3 – Зависимость образования продукта реакции перекись водорода – 4-ААП – фенол, катализируемой ионами Fe и Cu, от времени инкубации.

Из представленных данных видно (Рисунок 3.3), что кинетики реакции в присутствие ионов Fe или Cu различаются. В диапазоне времени 0 – 50 мин реакция идет интенсивнее в присутствие ионов Fe, по сравнению с реакцией,

катализируемой ионами Cu. Во временном диапазоне 50 – 100 мин образование продукта, наоборот, идет более интенсивно в присутствие ионов Cu, после чего реакция прекращается, о чем свидетельствует выход продукта на стационарный уровень. В то же время, из приведенных данных видно, что реакция, катализируемая ионами Fe, не прекращается в интервале времени 50 – 140 мин – наблюдается практически линейный прирост продукта.

В ходе исследований было показано, что при выбранных экспериментальных условиях (водная среда, концентрации ингредиентов и катализаторов) одновалентные ионы Na, двухвалентные ионы Mg, Ca, Cd и Zn, а также трехвалентные ионы Al не катализируют реакцию окислительного азосочетания – динамики образования продукта в присутствие перечисленных ионов и в контроле (без ионов) практически совпадают.

Также было показано, что добавление в реакционную смесь ЭДТА, хелатора ионов двухвалентных металлов, практически полностью нейтрализует каталитическую функцию, как ионов железа, так и ионов меди. Выход продукта реакции, катализируемой ионами Fe и Cu в присутствие ЭДТА (в эквимолярном соотношении ион : хелатор), составлял 15 % и 2 %, соответственно, от выхода продукта без использования хелатора. Полученные результаты хорошо согласуются с известными данными о константах связывания ионов железа и меди с ЭДТА (Metzler, 2003).

3.3 Элементный анализ поверхностных примесей МНА

При использовании МНА в качестве катализатора реакции окислительного азосочетания было установлено (Рисунок 3.4), что образование продукта идет примерно в 2 раза эффективнее в присутствие наночастиц с меньшими размерами кластеров (d_{50} = 49.6 нм), по сравнению с образованием продукта в ходе реакции, катализируемой наночастицами с большими размерами кластеров (d_{50} = 270 нм).

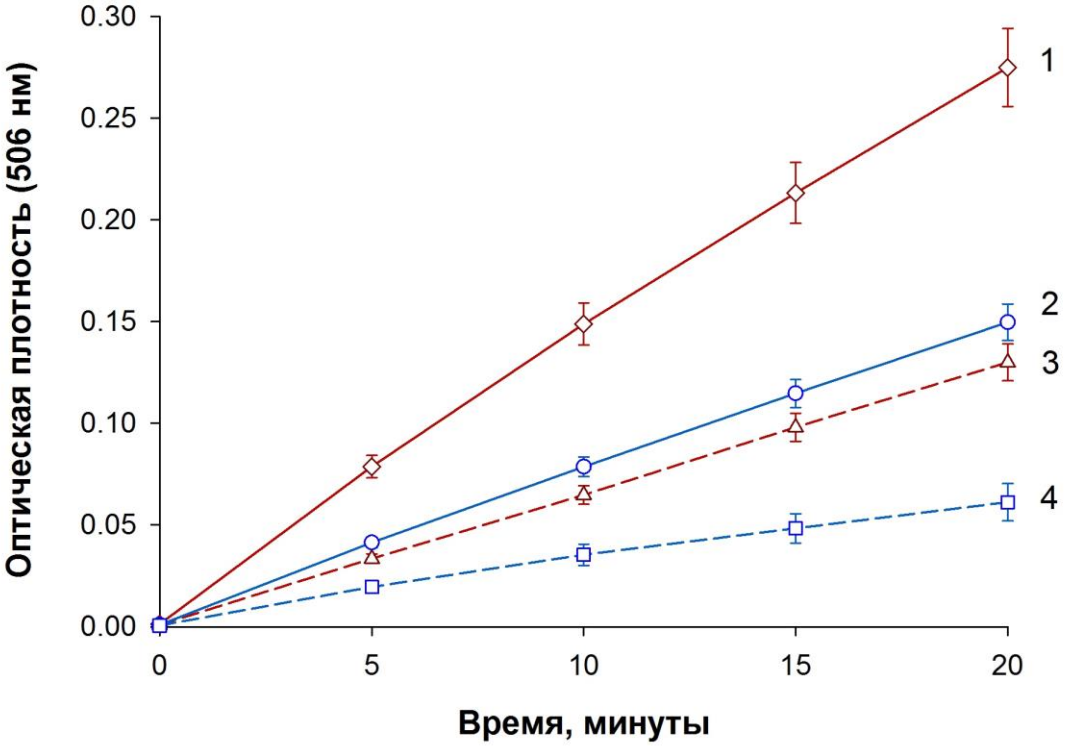


Рисунок 3.4 – Динамика образования продукта реакции, катализируемой МНА с меньшими (d_{50} = 49.6 нм) и большими (d_{50} = 270 нм) размерами кластеров без (1,2) и после (3,4) их предварительной обработки ЭДТА, в зависимости от времени.

Поскольку выше было показано (Рисунок 3.3), что катализировать образование продукта в реакции окислительного азосочетания могут только ионы Fe и Cu и известно, что оба иона могут обнаруживаться на поверхности МНА (Бондарь, Пузырь, 2004; Puzyr et al., 2005), был проведен элементный анализ поверхностных примесей МНА, использованных в данной работе.

Как показали исследования элементного состава поверхностных примесей двух образцов МНА (Таблица 3.1), процентное содержание ионов меди и железа у частиц МНА с меньшими размерами кластеров значительно (в 2 и 1.5 раза соответственно) выше, чем у наночастиц с большими размерами кластеров. Исходя из этого, можно с высокой долей уверенности говорить о том, что различия в каталитической активности МНА с разными размерами кластеров в реакциях взаимодействия органических соединений могут быть связаны с разным содержанием примесей ионов Fe и Cu на поверхности наночастиц. По крайней

мере, это продемонстрировано на примере реакции окислительного азосочетания перекись водорода – 4-ААП – фенол.

Таблица 3.1

Элементный состав образцов МНА с разными размерами кластеров.

Микропримеси металлов	Образцы МНА	
	RUDDM 0-125 (d_{50} = 49.6 нм)	RUDDM 200-500 (d_{50} = 270 нм)
Fe (мкг/мг)	4.6 ± 0.3	3.1 ± 0.3
Cu (мкг/мг)	1.3 ± 0.2	0.6 ± 0.2
O (мкг/мл)	10.12 ± 0.44	4.18 ± 0.64

В дополнительных экспериментах было показано, что предварительная обработка частиц МНА 0.1 М раствором ЭДТА для нейтрализации примесей ионов двухвалентных металлов (прежде всего ионов железа и меди) на поверхности наночастиц значительно ухудшает их каталитические свойства. Как видно из полученных данных (Рисунок 3.4), при использовании МНА с малыми (d_{50} = 49.6 нм) и большими (d_{50} = 270 нм) размерами кластеров, предварительно обработанных ЭДТА, выход продукта снижается в 2 и в 2.5 раза, соответственно.

Таким образом, эти результаты дополнительно свидетельствуют о том, что механизм каталитической функции МНА в реакции окислительного азосочетания (H_2O_2 – 4-ААП – фенол) реализуется за счет микропримесей ионов железа и меди, присутствующих на поверхности наночастиц. Эффективность МНА с разными размерами кластеров, как катализатора органических реакций, определяется количеством поверхностных примесей этих ионов, нейтрализация которых приводит к значительному снижению каталитических свойств данного наноматериала.

В то же время, полученные данные позволяют сделать важное предположение. Поскольку обработка МНА хелатором не приводит к полной

утрате их каталитической функции, нельзя исключить дополнительного механизма катализа, например, с участием химически активных кислородсодержащих функциональных групп, которые имеются на поверхности МНА (Gibson et al., 2009). Высказанное предположение требует дальнейшей экспериментальной проверки.

Полученные в данном разделе результаты расширяют представления о каталитической функции МНА в реакциях взаимодействия органических соединений и демонстрируют применимость частиц МНА при создании на их основе новых катализаторов и систем индикации для практического применения, например, в экологическом мониторинге для выявления в среде фенола и его производных.

ГЛАВА 4 Конструирование и изучение свойств биолюминесцентной тест-системы на основе МНА, люциферазы и полимерной матрицы

4.1 Создание и изучение комплекса МНА-люцифераза

Методология создания сенсорного элемента (комплекс МНА-люцифераза) для его последующего использования при конструировании индикаторной тест-системы основывалась на известных фактах сохранения каталитической функции ферментов, адсорбированных на поверхности МНА (Пуртов и др., 2001; Пузырь и др., 2004; Патент № 2306258, 2007). При этом совершенно очевидно, что оценка потенциальной возможности использования любого маркерного белка (например, фермента) в конструировании и создании систем индикации сопряжена с необходимостью исследования свойств маркера до и после его связывания с носителем (например, наночастицей). Исходя из этого, предварительно был проведён сравнительный анализ активности люциферазы в растворе и после ее адсорбции на поверхности наноалмазов (комплекс МНА-люцифераза).

Очевидно, что при многоразовом использовании тест-системы белок, входящий в ее состав, может длительное время находиться в условиях комнатной температуры и дополнительно многократно подвергаться воздействию повышенной температуры реакционной среды. В нашем случае это может происходить при инициации люминесцентной реакции впрыскиванием в реакционную смесь ФМН-H_2, восстановление которого осуществляется при облучении раствора ФМН лампой накаливания. В связи с этим важно знать, каким образом температурный фактор влияет на активность люциферазы. Для выяснения этого вопроса были проведены сравнительные исследования термостабильности фермента, находящегося в растворе и в составе индикаторного комплекса (МНА-люцифераза). С этой целью образцы высокоочищенной люциферазы (или индикаторного комплекса) инкубировали в термостате при температуре 36 °С. Через равные интервалы времени из образцов отбирали одинаковые по объему аликвоты и проводили измерение активности фермента.

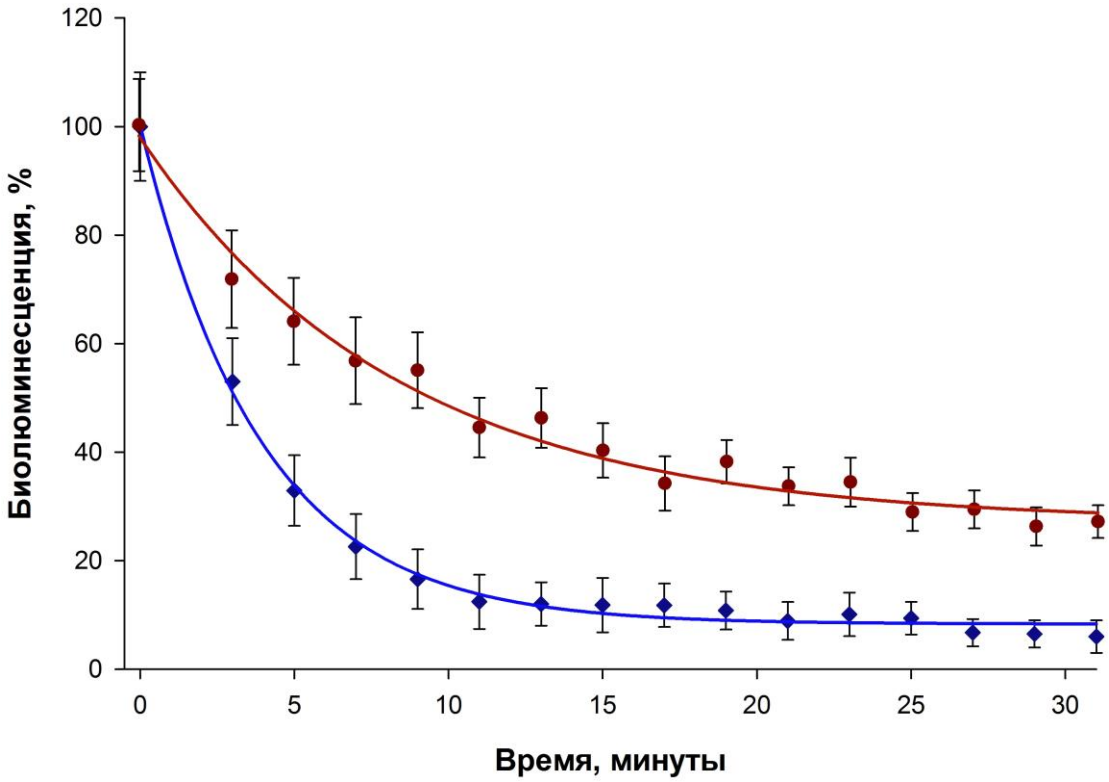


Рисунок 4.1 – Активность свободной люциферазы (◆) и в составе индикаторного комплекса МНА-люцифераза (●) в зависимости от времени инкубации при температуре 36 °С.

Из полученных данных следует (Рисунок 4.1), что люцифераза, адсорбированная на поверхности наночастиц, обладает существенно большей термоустойчивостью, по сравнению со свободным ферментом. С одной стороны, эти результаты хорошо согласуются с общеизвестными представлениями о том, что белки, адсорбированные на поверхности носителя, более резистентны к воздействию различных повреждающих факторов (протеолитические ферменты, температура, состав и pH среды, и т.д.). С другой – позволяют сделать вывод о том, что для создания люминесцентной тест-системы многоразового действия с использованием люциферазы целесообразна предварительная адсорбция фермента на частицы МНА.

Также значительным фактором, влияющим на функциональную активность фермента, является буферная система. В связи с этим была проведена

сравнительная оценка активности свободной люциферазы и после ее адсорбции на поверхность наночастиц (комплекс МНА-люцифераза) при использовании разных буферных систем. Для этого эксперимента использовали буферные системы с нейтральным значением pH: трисовый, бис-трис пропановый, аммоний ацетатный, натрий ацетатный, а также фосфатный буфер.

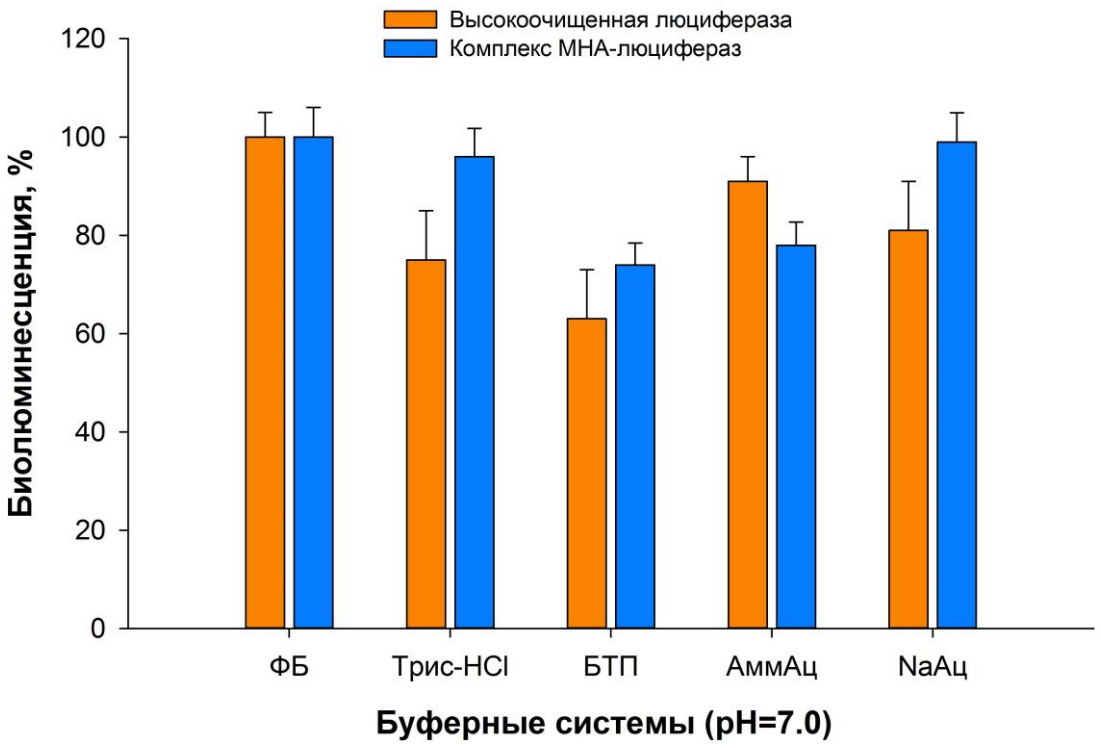


Рисунок 4.2 – Активность свободной люциферазы и в составе индикаторного комплекса МНА-люцифераза в различных буферных систем с нейтральным значением pH.

Как видно из представленных данных (Рисунок 4.2), во всех случаях замена фосфатного буфера на другие буферные системы приводит к снижению активности свободной люциферазы. Однако фермент, адсорбированный на частицах МНА, практически во всех случаях обладает большей активностью в использованных буферных системах, по сравнению со свободным ферментом.

4.2 Выбор оптимальной полимерной матрицы

При выборе полимерной матрицы были исследованы сорбенты (Таблица 4.1), производимые различными зарубежными фирмами на основе полисахаридов (декстран, агароза) и выпускаемые в виде гранул, применяемых в качестве носителей для колоночной хроматографии биополимеров (Остерман, 1985).

Таблица 4.1

Сорбенты полисахаридной природы, использованные в работе в качестве полимерной матрицы

Марка	Фирма-производитель	Состав
Sepharose 4B	Pharmacia Fine Chemicals	Агароза
Ultrogel AcA 22	LKB	2 % акриламида, 2 % агарозы
Ultrogel AcA 34	LKB	3 % акриламида, 4 % агарозы
Ultrogel AcA 44	LKB	4 % акриламида, 4 % агарозы
Ultrogel AcA 54	LKB	5 % акриламида, 4 % агарозы
Sephadex	Sigma	Декстран
Sephocryl	Pharmacia	Декстран + акриламид
Bio-Gel P	Bio-Rad	полиакриламид

Как показали исследования, для конструирования тест-системы наиболее оптимальной матрицей по своим свойствам и структуре является Sepharose 4B. Полимерные гранулы сефарозы хорошо плавятся, образуя однородный гель, который при застывании обладает достаточно прочной адгезией по отношению к различным поверхностям подложек (стекло, пластик, металл) и после высушивания прочно удерживается на ее поверхности.

Результаты сравнительных исследований показали, что полимерные гранулы, производимые на основе двух компонентов (агароза и акриламид)

(Таблица 4.1), оказались малопригодными для создания тест-системы. После их плавления и нанесения на подложки они формировали неравномерный слой, образуя комки акриламида, вероятно из-за того, что температура его плавления выше, чем у агарозы. Кроме того, при измерении активности люциферазы, адсорбированной на поверхности такого двухкомпонентного геля (матрицы), наблюдались крайне нестабильные сигналы с резкими всплесками и падениями значений световых импульсов.

Полимерные гранулы, производимые на основе декстрана и полиакриламида (Таблица 4.1), как оказалось, также малопригодны для создания тест-системы. При плавлении они образуют жидкий и мало застывающий гель, который достаточно легко удаляется с поверхности подложек водой и буферными растворами.

Дальнейшее исследование свойств сефарозы показало, что данная полимерная матрица, закрепленная на подложке, достаточно эффективно адсорбирует люциферазу с сохранением ее ферментативной активности (Рисунок 4.3). Конструкцию, состоящую из подложки и закрепленной на ней матрицей, помещали в раствор высокоочищенного фермента на 15 минут для инкубации. После этого, конструкцию извлекали из раствора фермента, промывали дистиллированной водой, помещали реакционную кювету биолюминометра и проводили измерения ее активности.

Интенсивность свечения иммобилизованной на подложке тест-системы матрица–люцифераза после спада (от 278 до 35 отн. ед.), наблюдаемого при первых четырех измерениях и связанного, вероятно, с частичной десорбцией слабо связанных с матрицей молекул фермента, выходит на постоянный уровень со средней величиной сигналов 31 отн. ед. (измерения 4 – 12). После этого отмечается некоторое снижение величины сигналов и переход системы на новый постоянный уровень (18 ± 3,5 отн. ед.), который сохраняется при дальнейших измерениях. Также, можно предположить, что снижение активности фермента, наблюдаемое в ходе первых измерений (Рисунок 4.3), может быть связано с его

частичной инактивацией вследствие высокой температуры реакционной среды при периодическом впрыскивании для запуска реакции нагретого до 35 – 40 ˚С раствора ФМН-H_2, восстановление которого происходит при освещении лампой накаливания.

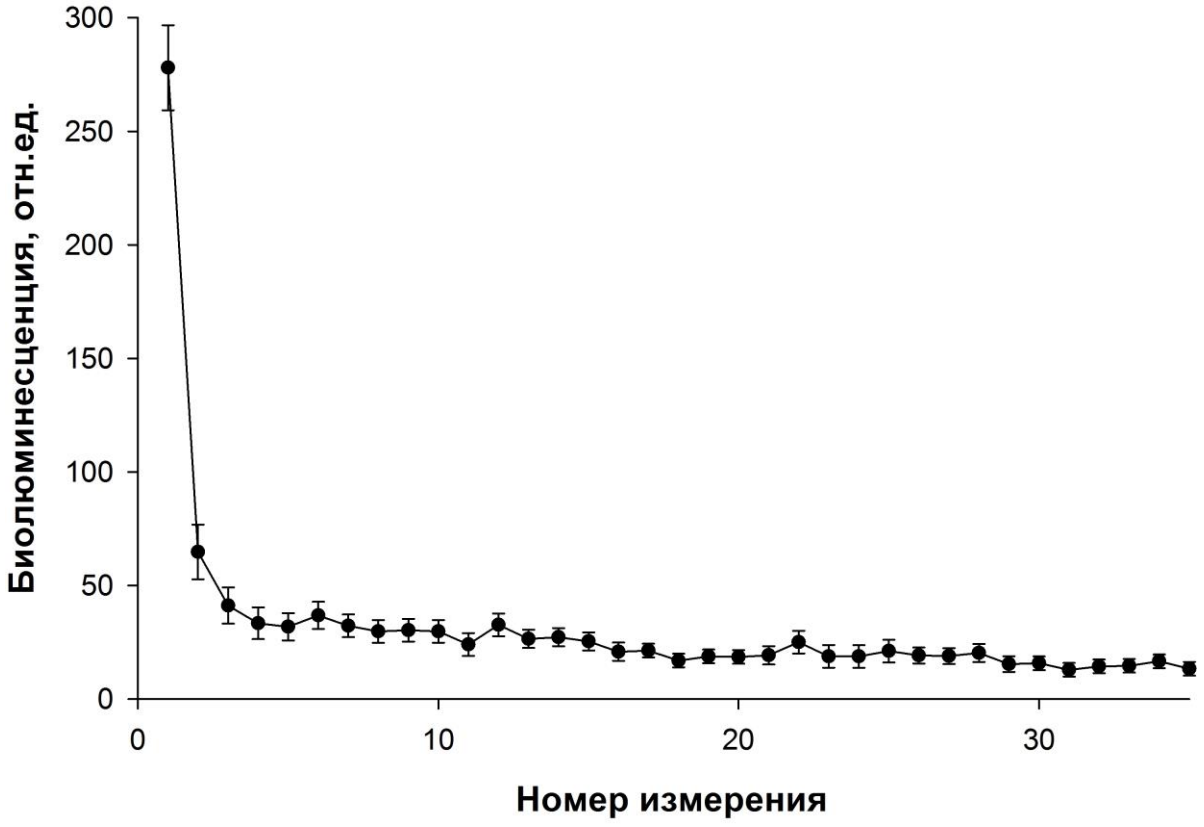


Рисунок 4.3 – Динамика интенсивности люминесцентных сигналов при многократном использовании системы матрица–люцифераза.

Таким образом, в ходе экспериментов было обнаружено, что нанесенная на подложку сефароза, не содержащая МНА, способна адсорбировать молекулы люциферазы с сохранением их активности.

Известно, что для устранения неспецифической сорбции белков на гранулах агарозных сорбентов (например, сефарозах) применяют раствор хлористого натрия, добавляемого в буферную систему (Остерман, 1985). Однако в ходе дополнительных исследований было показано, что инкубация подложек с

нанесенной сефарозой в водном растворе люциферазы, содержащем 0,1 М NaCl, не препятствует неспецифической сорбции фермента на матрицу.

4.3 Конструирование тест-системы на основе полимерной матрицы, МНА и люциферазы

При выполнении экспериментов было установлено, что подложка для конструкции тест-системы в виде стеклянного стержня (диаметр 1,5 мм) является наиболее подходящей для проведения люминесцентного тестирования, учитывая технические особенности кюветного биолюминометра БЛМ 8801. Последовательность стадий конструирования такой тест-системы и ее вид представлены на схеме (Рисунок 4.4). Для тестирования интенсивности люминесцентных сигналов тест-систему помещали в кювету люминометра, содержащую измерительный буфер, и добавкой необходимых ингредиентов запускали реакцию светоизлучения. После регистрации светового сигнала тест-систему извлекали из кюветы, промывали струей воды для удаления продуктов реакции и снова использовали для измерения.

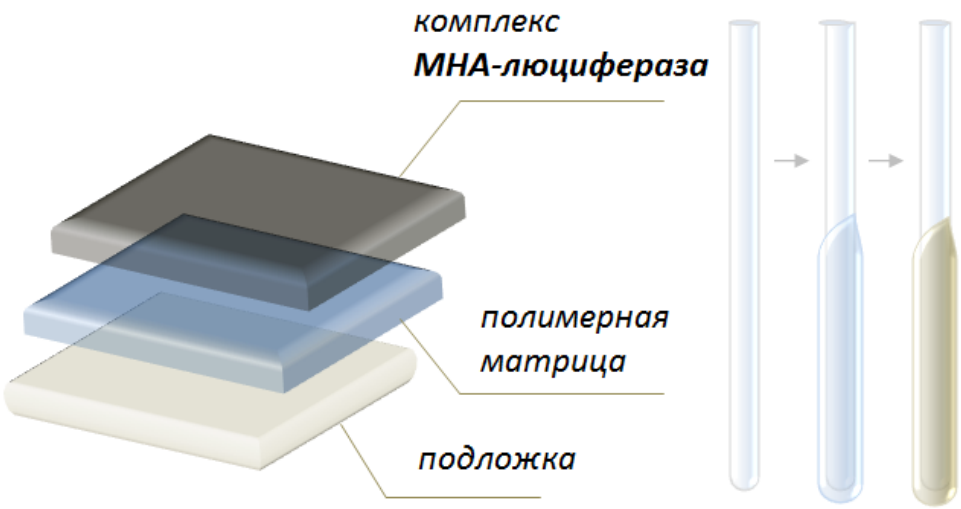


Рисунок 4.4. Общая схема конструирования индикаторной тест-системы на основе частиц МНА, люциферазы и полимерной матрицы.

В работе были сконструированы и апробированы 3 индикаторные тест-системы с разными вариантами последовательного нанесения на подложку

органической матрицы, частиц МНА и маркерного белка – люциферазы. Первая: подложка + органическая матрица–МНА + люцифераза; вторая: подложка + органическая матрица + МНА + люцифераза; третья: подложка + органическая матрица + комплекс МНА-люцифераза. Особое внимание при этом фокусировалось на сохранении ферментативной активности иммобилизованного белка, достаточного для проведения измерений с использованием полученных тест-систем, и возможности многократного использования сконструированных тест-систем.

4.3.1 Тест-система «полимерная матрица–МНА + люцифераза»

В первом варианте создания биолюминесцентной индикаторной тест-системы было предпринято использование двухкомпонентной матрицы (гель–МНА) для иммобилизации на нее люциферазы путем физической адсорбции. Для этого к раствору расплавленной матрицы добавляли гидрозоль МНА в соотношении 1 : 1 (объем : объем). Полученную суспензию инкубировали в термоустойчивой пробирке на кипящей водяной бане с перемешиванием с целью образования однородной смеси полимерная матрица–МНА. Полученный однородный расплавленный гель наносили на поверхность стеклянной подложки. Известно, что застывший гель представляет собой не вполне равновесную систему: со временем он несколько уплотняется, выдавливая из себя жидкость. Этот процесс идет вначале довольно быстро, а затем – достаточно медленно (Остерман, 1985). Поэтому, для более быстрого и эффективного высушивания двухкомпонентной матрицы гель–МНА на стеклянной подложке ее помещали на 30 секунд в раствор ацетона, который «экстрагировал» часть воды из геля. Для дальнейшего полного высушивания нанесенного геля подложку оставляли на воздухе при комнатной температуре на 3-ое суток. При этом предполагалось, что при застывании геля частицы МНА, локализованные у поверхности будут выступать наружу, удерживаясь в порах геля. На завершающей стадии для связывания маркерного белка подложку с двухкомпонентной матрицей гель–

МНА помещали в раствор высокоочищенной люциферазы на 15 мин. При этом, очевидно, что белок адсорбировался как на частицы МНА, находящиеся на поверхности матрицы, так и на саму матрицу. После инкубации полученную тест-систему промывали струей дистиллированной воды для удаления слабо адсорбированных молекул фермента.

Для измерения интенсивности биолюминесценции полученную систему помещали в буфер, находящийся в измерительной кювете люминометра, и добавкой необходимых ингредиентов запускали биолюминесцентную реакцию. После проведения измерения систему вынимали из измерительной кюветы, промывали водой для удаления продуктов реакции и снова проводили измерение.

Как следует из величины люминесцентных сигналов (Рисунок 4.5), регистрируемых при многоразовом использовании сконструированной тест-системы, люцифераза вполне удовлетворительно сохраняет в ней свою ферментативную активность. Из приведенных на рисунке данных видно, что при первых шести измерениях интенсивность люминесценции наибольшая (9,3 ± 0,7 отн. ед.), затем она снижается и выходит на стабильный постоянный уровень (4,0 ± 0,5 отн. ед.) при последующих 30-ти измерениях. Тот факт, что интенсивность сигналов не сразу приобретает постоянный уровень, а выходит на плато с понижением сигналов, может свидетельствовать о десорбции части белка, обусловленной конструкцией данной тест-системы, поскольку фермент мог быть иммобилизован с разной прочностью связывания из-за адсорбциии фермента на разных поверхностях носителей – на частицах МНА и на матрице. Также снижение люминесцентных сигналов, возможно, является следствием частичной инактивации фермента под действием высокой температуры реакционной среды.

Исходя из этого, была выдвинута гипотеза о том, что под действием температурного фактора, возможно, могут происходить какие-либо конформационные изменения молекул люциферазы, например, переход из менее устойчивого (термолабильного) состояния в более устойчивое состояние – термостабильное.

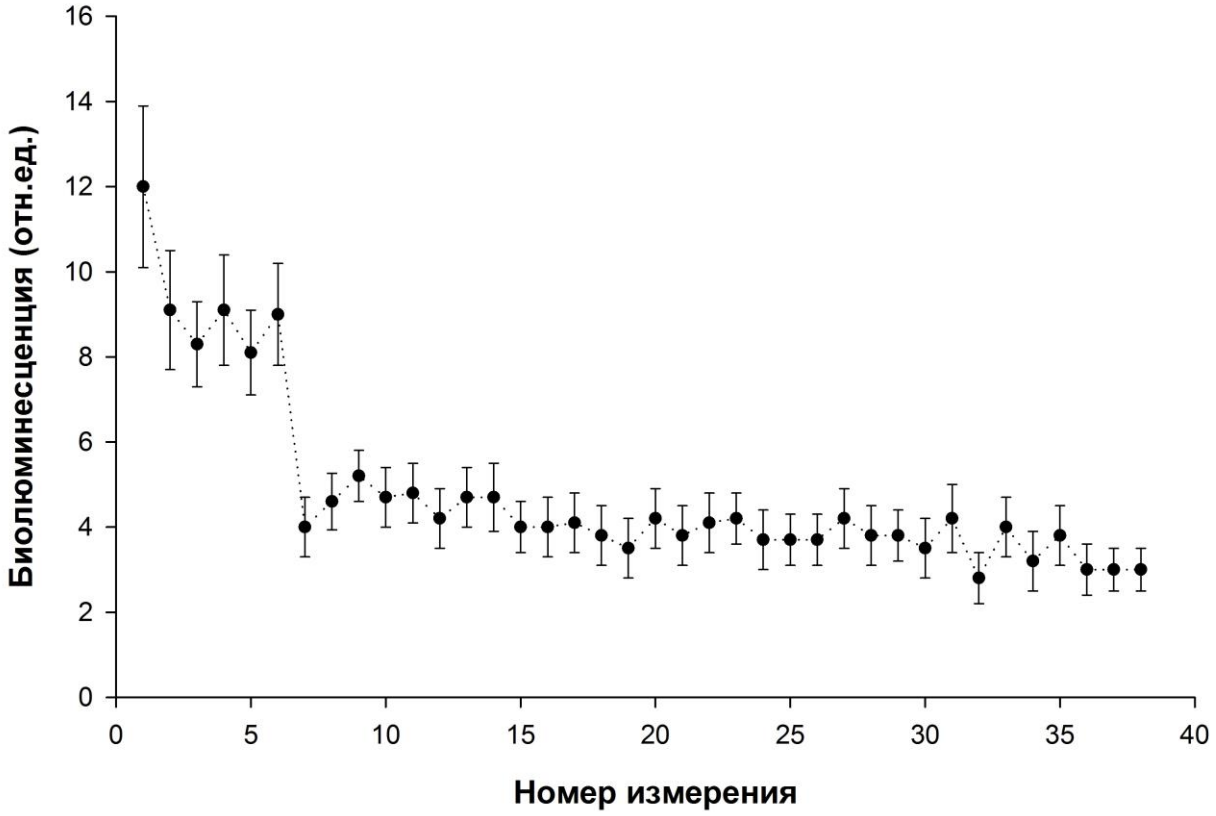


Рисунок 4.5 – Динамика интенсивности люминесцентных сигналов при многоразовом использовании тест-системы, созданной с применением комплекса МНА-люцифераза и полимерной матрицы.

Для проверки данного предположения была предложена процедура, направленная на предварительную инактивацию термолабильных молекул фермента с помощью температурной обработки тест-системы. Последовательность процедур была следующей. Подложку с нанесенной на нее матрицей и МНА после инкубации в растворе люциферазы промывали струей дистиллированной воды для удаления слабо адсорбированных молекул фермента. Проводили однократное измерение интенсивности люминесценции полученной тест-системы (для определения начальной активности адсорбированной люциферазы), затем систему извлекали из измерительной кюветы и, после отмывки водой от продуктов реакции, помещали на 15 секунд в кювету с водой,

нагретой до 45 °С. После этого снова проводили измерения активности тест-системы по стандартной схеме, приведенной выше.

В результате было показано, что после температурной обработки (Рисунок 4.6) интенсивность люминесцентных сигналов тест-системы приобретает стабильный постоянный уровень (4,0 ± 0,4 отн. ед.). Регистрируемые световые сигналы являются вполне достаточными (одна люминесцентная единица составляла 10^8 фотонов в 1 секунду) для регистрации и дают возможность использовать полученную тест-систему для микроанализа.

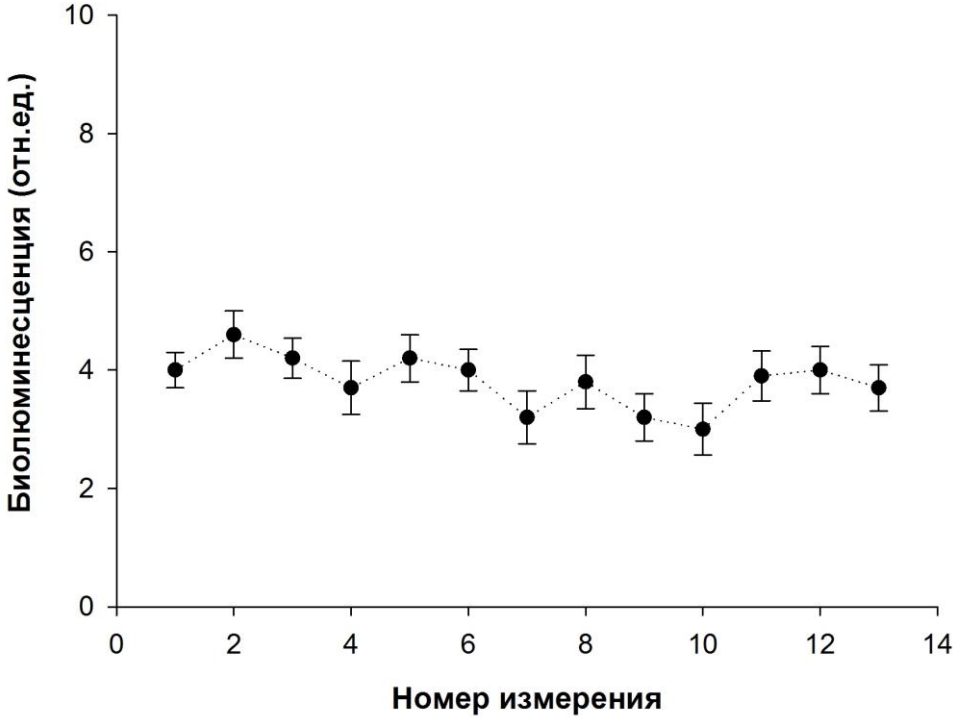


Рисунок 4.6 – Интенсивность сигналов тест-системы после температурной обработки при 45 °С.

Вероятно, это может свидетельствовать в пользу сказанного выше предположения о конформационных изменениях молекул рекомбинантной люциферазы, которые происходят в результате температурного влияния. Таким образом, полученные данные выявили новую информацию о свойствах рекомбинантной люциферазы, которая может учитываться, в частности, при создании индикаторных тест-систем на основе люциферазы.

В целом надо отметить, что тест-система, сконструированная по описанной выше схеме, не смывается со стеклянной подложки при многократной промывке струей воды и впрыскивания в кювету раствора ФМН, что говорит о её хорошей адгезии, прочности данной конструкции и возможности многоразового применения. В экспериментах было установлено, что с одной системой можно осуществлять многоразовые измерения, регистрируя вполне стабильные люминесцентные сигналы с небольшой динамикой к снижению.

Для большей стабилизации сигналов при многократном использовании тест-системы была предпринята попытка в устранении наблюдаемого снижения активности после первых нескольких измерений. Поскольку возможной причиной наблюдаемого эффекта может быть десорбция части иммобилизованного маркерного белка, для ее устранения было решено покрыть готовую тест-систему дополнительным слоем сефарозы, но с пониженной концентрацией полисахарида. Предполагалось, что «поры» дополнительного наружного слоя матрицы будут препятствовать вымыванию молекул фермента в случае десорбции, и в то же время будут позволять свободно проникать низкомолекулярным субстратам реакции к молекулам люциферазы.

Проверка этого варианта осуществлялась следующим образом. Подложка с нанесенной тест-системой быстро обмакивалась в расплавленную (температура составляла около 50 °С, точка образования геля – 45 °С) полимерную матрицу, разведенную в два раза водой. Однако последующее тестирование интенсивности люминесцентных сигналов показало, что такая предварительная обработка тест-системы приводит к полной потери функциональной активности тест-ситемы. Очевидно, что высокая температура расплавленной сефарозы, используемой для дополнительного покрытия, приводит к быстрой и полной термоинактивации люциферазы. Таким образом, такой подход лимитировать или устранить десорбцию фермента с поверхности тест-системы в данном случае оказался неподходящим для конструирования тест-системы.

4.3.2 Тест-система «полимерная матрица + МНА + люцифераза»

Известно, что гели агарозы имеют сетчатую структуру и в расплавленном виде (Остерман, 1985). При застывании агарозы поры геля уменьшаются. Исходя из этого, была предпринята попытка внедрения частиц МНА в поры агарозного геля Sepharose 4B для более прочного закрепления частиц. С этой целью сразу после нанесения сефарозы на поверхность стеклянной подложки, когда поры матрицы были доступны для наночастиц, она помещалась в 5 % гидрозоль МНА на 30 минут, таким образом, наночастицы проникали в поры на поверхности матрицы и связывались с ней. Затем подложку промывали в воде для удаления тех частиц МНА, которые слабо связались с матрицей. После этого полученную систему высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение 3-х суток. На завершающей стадии подложку помещали в раствор люциферазы на 15 мин для связывания маркерного белка. При этом белок адсорбировался на частицы МНА, которые располагались на наружном слое матрицы. Также часть молекул фермента могла адсорбироваться и на самой матрице, где МНА не связались с ней. После инкубации в растворе фермента полученную систему извлекали, промывали струей дистиллированной воды для удаления слабо адсорбированных молекул фермента, помещали в буфер, находящийся в измерительной кювете, и добавкой необходимых ингредиентов запускали реакцию. После измерения систему вынимали из измерительной кюветы, промывали водой для удаления продуктов реакции и снова проводили измерение.

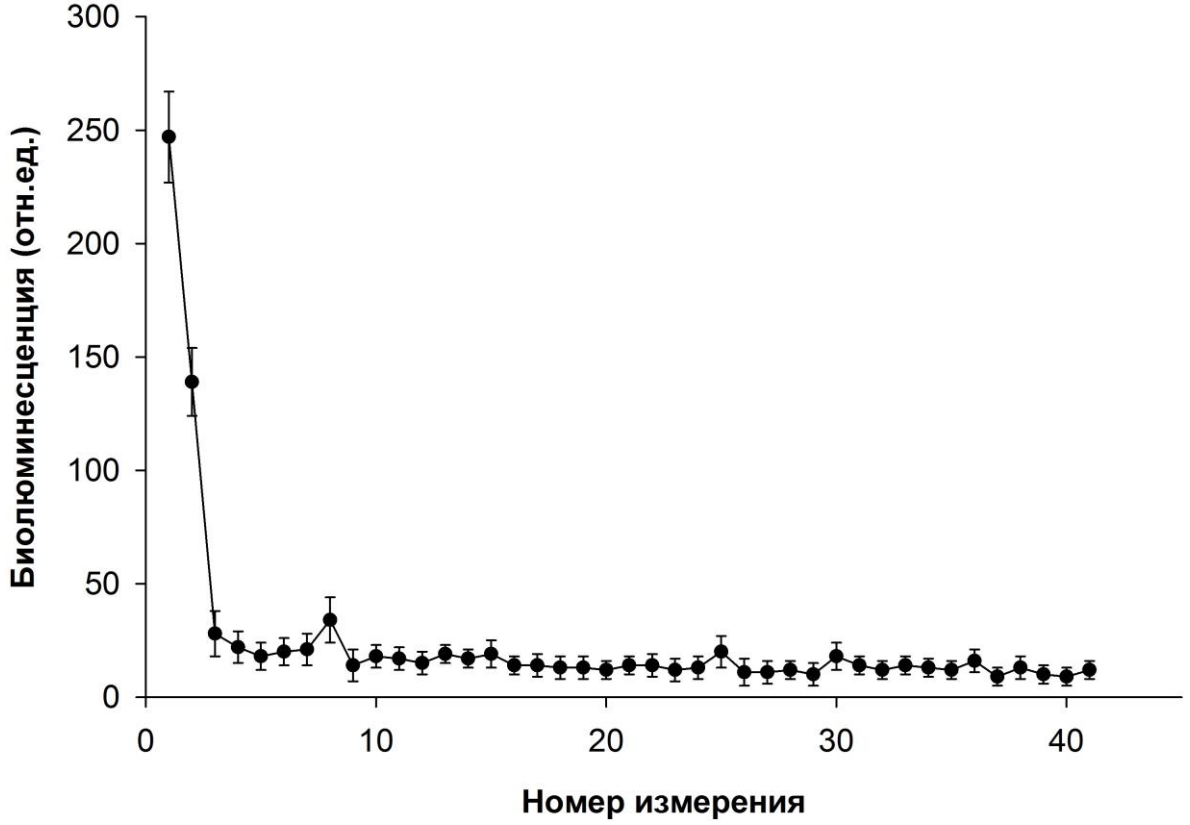


Рисунок 4.7 – Динамика интенсивнсти люминесцентных сигналов при многократном использовании тест-системы.

Как показали исследования (Рисунок 4.7), люцифераза вполне удовлетворительно сохраняет свою ферментативную активность в полученной тест-системе. При первых двух измерениях интенсивность люминесцентных сигналов достаточно большая: 248 и 139 относительных единиц. После этого сигналы выходят на стабильный постоянный уровень при многократных тестировании системы (в среднем 13,8 ± 2,5 отн. ед.). Как и в случаях, описанных выше, эффект снижения люминесцентной активности системы после первых измерений может объясняться частичной десорбцией фермента с носителя, либо частичной его инактивацией под действием повышенной температуры измерительной среды.

В ходе исследований было установлено, что конструкция разработанной тест-системы (как и тест-система, описанная в разделе 4.3.1) является прочной и устойчивой к физическим воздействиям (промывка струей дистиллированной

воды и впрыск фотовосстановленного ФМН для запуска реакции), позволяя проводить с одной тест-системой до 40 и более измерений.

4.3.3 Тест-система «полимерная матрица + комплекс МНА-люцифераза»

Как и в предыдущем разделе, для прочного закрепления МНА и люциферазы в тест-системе была предпринята попытка внедрения индикаторного комплекса в поры агарозного геля Sepharose 4B до его застывания. В данном варианте для иммобилизации на поверхность матрицы использовался предварительно полученный индикаторный комплекс МНА–люцифераза.

Приготовление комплекса МНА-люцифераза состояло в следующем. К 1 мл высокоочищенной люциферазы добавляли 15 мкл гидрозоля МНА (концентрация наночастиц 1,5 масс. %). После перемешивания суспензии наночастицы с адсорбированным белком осаждали центрифугированием при ускорении 16100 g в течение 3 минут при 4 °С. Полученный осадок ресуспендировали в 50 мкл воды для получения концентрированного препарата, содержащего комплекс МНА-люцифераза, который использовали в дальнейшем для иммобилизации.

После нанесения геля на подложку её помещали на 15 минут в коллоидный раствор МНА с адсорбированной люциферазой (комплекс МНА–люцифераза). Затем тест-систему извлекали и промывали струей дистиллированной воды для удаления слабо закрепившегося комплекса МНА-люцифераза. После этого проводили стандартные (см. выше) измерения активности люциферазы в составе сконструированной тест-системе.

Как видно из представленных данных (Рисунок 4.8), после первого измерения активности люциферазы в данной тест-системе (25 отн. ед.), как и в предыдущих случаях, наблюдается снижение величины сигналов (среднее значение 5,3 ± 1,6 онт. ед. (измерения 2 – 8)).

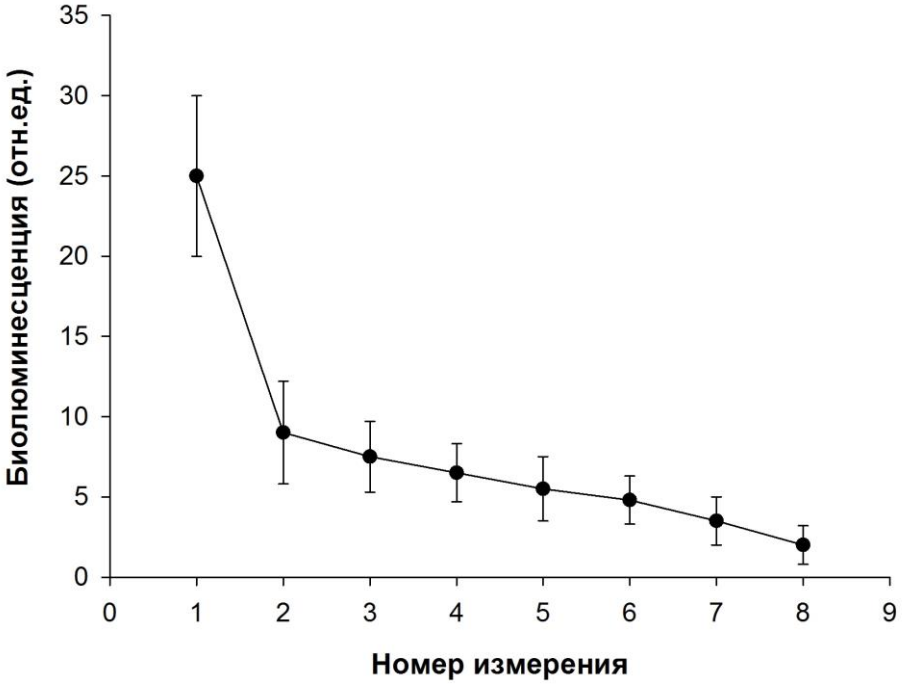


Рисунок 4.8 – Динамика интенсивности люминесцентных сигналов при многократном использовании тест-системы с индикаторным комплексом МНА-люцифераза.

Однако можно видеть, что данной тест-системе характерно более быстрое снижение величины сигналов при многократном использовании, что не дает возможности выполнять большого количества измерений с этой тест-системой, по сравнению с системами описанными выше. Вероятно, что более крупному комплексу (МНА-люцифераза) по сравнению с отдельными частицами МНА сложнее проникнуть в поры геля и прочно закрепиться на поверхности матрицы. К тому же, значительная часть молекул фермента адсорбированного на поверхности МНА, которая взаимодействует непосредственно с матрицей, становится пространственно недоступной для реагентов и является «выключенной» для реакции.

Таким образом, на основании результатов проведенных исследований, можно сделать вывод о том, что наиболее оптимальными характеристиками (сохранение ферментативной активности люциферазы и многократность использования) обладают тест-системы вида «органическая матрица–МНА +

люцифераза» (раздел 4.3.1) и «органическая матрица + МНА + люцифераза» (раздел 4.3.2).

4.4 Обоснование необходимости использования МНА в конструировании индикаторных тест-систем

Результаты проведенных выше экспериментов показывают, что существует два варианта фиксации люциферазы на твердой подложке при создании индикаторной тест-системы.

Первый – с использованием комбинированного материала полимерная матрица–МНА (Рисунки 4.5 – 4.8).

Второй – с использованием только полимерной матрицы (Рисунок 4.3).

Второй вариант следует из неожиданного результата, который был получен в ходе исследований, так как общеизвестно, что гранулы сорбентов на основе агарозы, которые применяли в данной работе, используются в качестве молекулярного сита для гель-фильтрационной колоночной хроматографии, разделяют белки по размерам молекул и не должны обладать неспецифической сорбцией. Кроме того, для устранения возможного неспецифического взаимодействия (сорбции) белков с носителем при хроматографии на таких сорбентах используют растворы хлорида натрия.

При исследованиях в данной работе было показано, что в случае расплавления гранул сефарозы применение NaCl не снимает неспецифическую сорбцию молекул люциферазы. Исходя из этого, нельзя исключить, что под воздействием температурной обработки в геле агарозы образуются свободные химически активные группы (например, гидроксильные), которые могут взаимодействовать с молекулами фермента, образуя водородные связи. Вероятно, они и являются центрами связывания молекул люциферазы.

Для демонстрации необходимости использования частиц МНА в конструировании биолюминесцентой тест-системы с целью улучшения ее свойств были проведены сравнительные эксперименты по многоразовому использованию

двух видов тест-систем: с включением частиц МНА и без них. Из данных, приведенных на Рисунке 4.9 (измерения 16 – 35), следует, что адсорбция люциферазы на матрице, содержащей частицы МНА, позволяет получать при многократном использовании примерно в 2 раза большую интенсивность светового сигнала тест-системы (13,3 ± 1,6 отн. ед.) по сравнению с адсорбцией люциферазы на чистую матрицу (7,8 ± 1,4 отн. ед.).

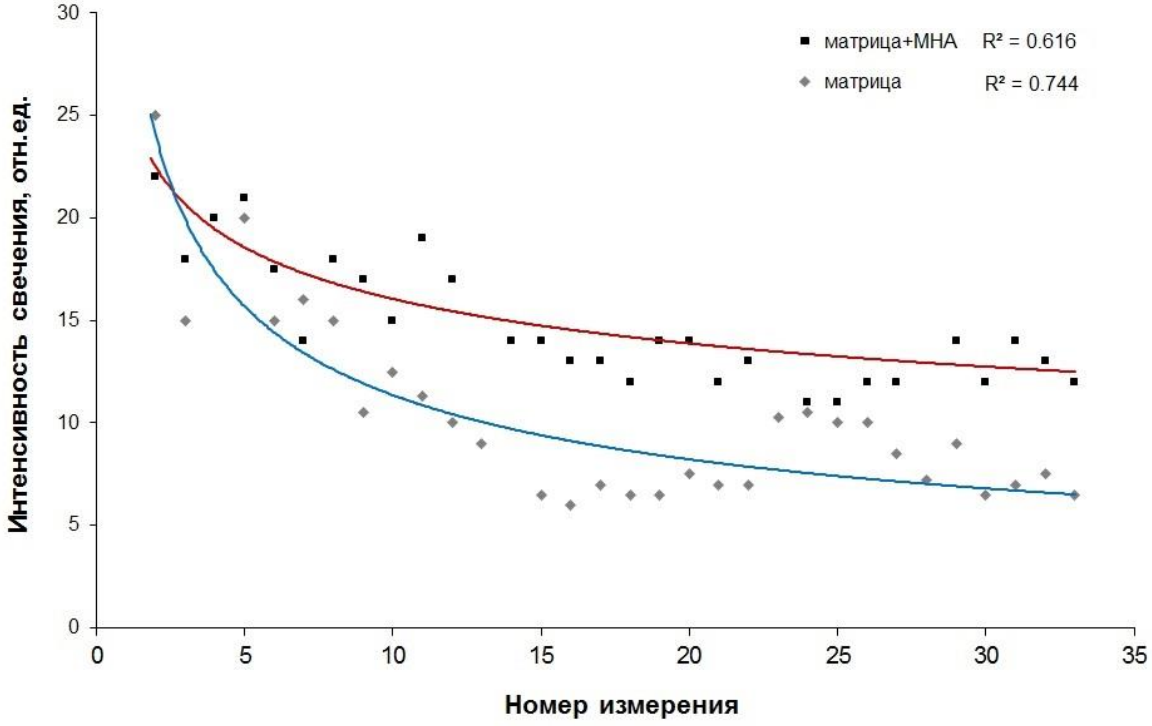


Рисунок 4.9 – Активность адсорбированного фермента при использовании матрицы и матрицы с МНА.

Кроме того, из данных, приведенных на Рисунке 4.10, следует, что инактивация люциферазы связанной с матрицей, содержащей МНА, происходит существенно медленнее по сравнению с ферментом, связанным только с матрицей.

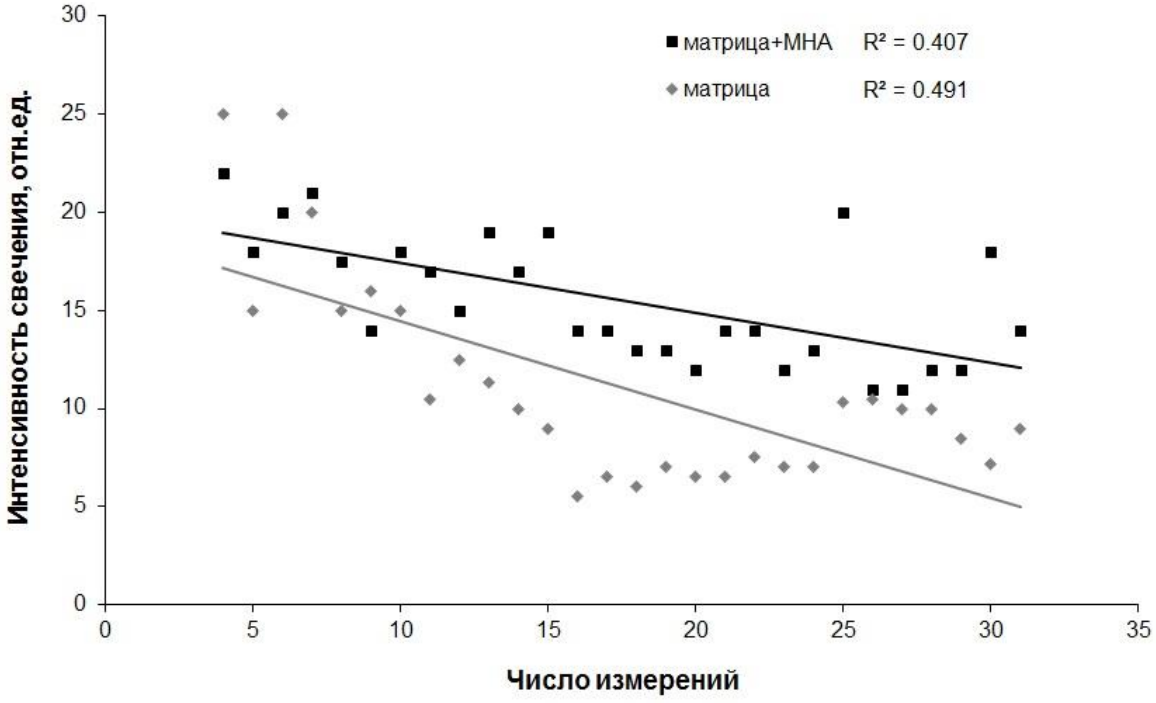


Рисунок 4.10 – Линейный тренд, демонстрирующий снижение активности адсорбированного фермента при использовании чистой матрицы и матрицы с МНА.

Полученные данные позволяют сделать важный вывод о том, что с целью стабилизации сигнала и более длительной эксплуатации тест-системы при ее создании, в дополнение к матрице, целесообразным является использование частиц МНА в качестве основы для иммобилизации на их поверхность молекул люциферазы. Фермент в этом случае меньше подвержен температурной инактивации и дольше сохраняет свою активность при многократном тестировании.

4.5 Получение индикаторного комплекса МНА-люцифераза с использованием белкового экстракта

В ходе исследований тест-системы на основе МНА, высокоочищенной люциферазы и сефарозы в качестве полимерной матрицы было установлено, что при многократном тестировании интенсивность регистрируемых сигналов не сразу приобретает постоянный уровень, а постепенно выходит на него, что является недостатком данной индикаторной системы при ее практическом применении для биолюминесцентного микроанализа.

Как уже говорилось выше, постепенное снижение интенсивности сигналов и выход их на постоянный уровень при многократном использовании люминесцентной тест-системы может объясняться двумя причинами. Во-первых, деградацией части молекул фермента из-за повышенной температуры реакционной среды при добавлении в нее раствора субстрата (ФМН-H_2), который при восстановлении с помощью облучения лампой накаливания нагревается до 35 – 40 °С. Во-вторых, частичной десорбцией фермента из комплекса МНА-люцифераза на начальных этапах использования системы.

Исходя из этого, была предпринята попытка получения более устойчивого индикаторного комплекса МНА-люцифераза. Основанием, свидетельствующим в пользу возможности решения данной проблемы, являлось следующее.

В исследованиях, связанных с выделением рекомбинантной люциферазы в объеме (*in batch*) из экстрактов бактериальных клеток *E. coli* с помощью МНА, была установлена возможность трех механизмов взаимодействия фермента с поверхностью частиц (Puzyr et al., 2007; Ронжин и др., 2010). Лабильное связывание с сохранением активности и возможностью последующей десорбции (около 40 % белка); прочное, вероятно многоточечное, связывание фермента с утратой активности (около 40 – 45 % белка); прочная адсорбция с сохранением активности и невозможностью элюции (примерно 15 % белка). Из этого следует важный практический вывод: в процессе выделения рекомбинантной люциферазы из экстрактов бактериальных клеток *E. coli* с помощью наноалмазов возможно

получение устойчивого комплекса МНА–люцифераза. Нельзя исключить, что такая устойчивость комплекса объясняется одновременной адсорбцией на поверхность частиц помимо люциферазы широкого спектра белков грубого экстракта *E. coli*. Вероятно, в этом случае белковое окружение может повышать стабильность фермента (например, за счет белок-белковых взаимодействий) и влиять на прочность его связывания с поверхностью МНА.

Исходя из изложенных фактов, можно допустить, что получение такого (более устойчивого) комплекса и его последующее введение в полимерную матрицу позволит разработать индикаторную тест-систему многоразового действия со стабильным уровнем регистрируемых люминесцентных сигналов.

В результате оптимизации вышеизложенной схемы очистки фермента все стадии выделения белка осуществляли в 5 %-м растворе D-глюкозы. Использование D-глюкозы представлялось целесообразным, поскольку известно, что углеводы могут оказывать защитное действие на белки, например, при их хранении, замораживании и лиофильном высушивании (Франк, 2009). Осадок МНА, полученный на завершающей стадии очистки люциферазы (после многократной элюции белка) и содержащий наночастицы с прочно связанным ферментом (устойчивый комплекс МНА-люцифераза), ресуспендировали в 5 %-ой D-глюкозе и использовали в работе.

Конструирование тест-системы с использованием полученного комплекса МНА–люцифераза проводили по стандартной схеме нанесения компонентов на стеклянную подложку. Последовательность процедур при многоразовом измерении активности полученной тест-системы была прежней (см. выше).

Измерения активности данной тест-системе проводили в двух вариантах: без температурной обработки (Рисунке 4.11) и после предварительной температурной обработки – тест-систему помещали на 15 секунд в кювету с водой, нагретой до 45 °С (Рисунок 4.12).

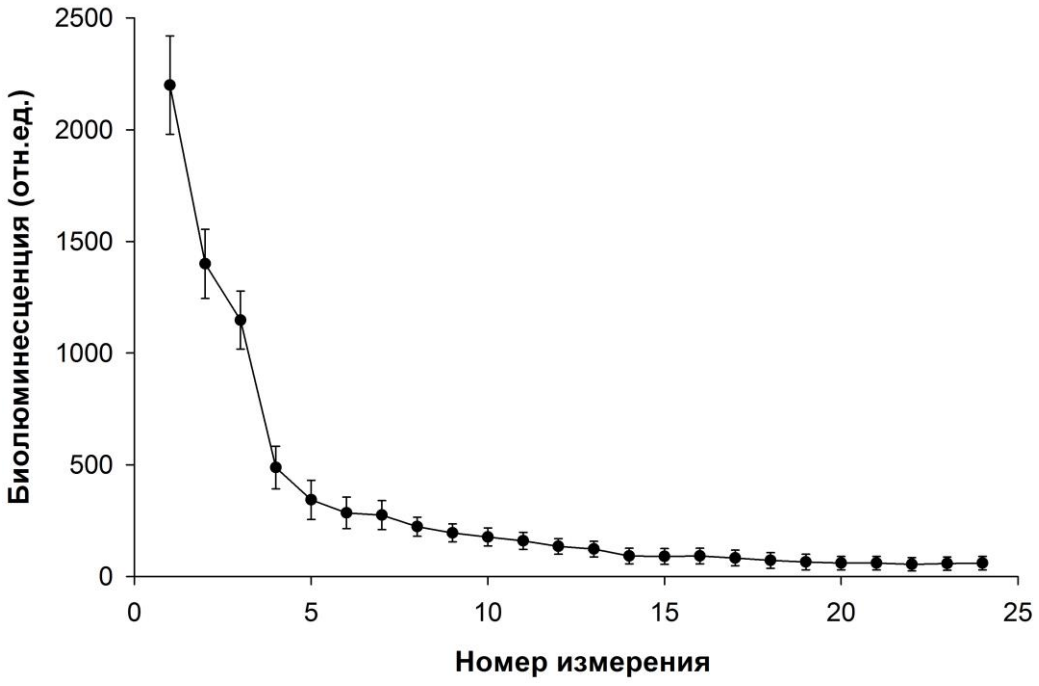


Рисунок 4.11 – Динамика интенсивности люминесцентных сигналов при многократном использовании тест-системы без температурной обработки.

Было показано (Рисунок 4.11), что, как и в предыдущих случаях, наблюдается снижение люминесцентных ответов полученной тест-системы при ее многократном использовании. Однако следует заметить, что в данном случае снижение сигналов имеет более «плавный» характер (от 2500 отн. ед. при первом измерении до 1130 отн. ед. – при третьем). Обращает на себя внимание и величина регистрируемых световых импульсов, которая значительно превышает интенсивность сигналов, полученных при исследовании тест-систем на основе высокоочищенной люциферазы. Вероятно, эти факты могут косвенно свидетельствовать в пользу большей стабильности и активности индикаторного комплекса МНА-люцифераза, входящего в состав тест-системы.

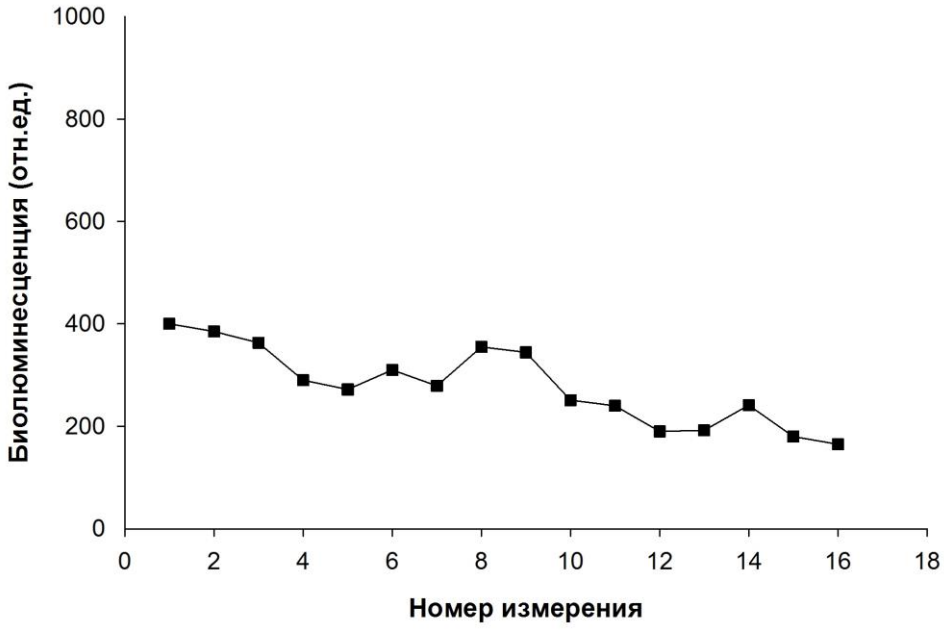


Рисунок 4.12 – Динамика интенсивности регистрируемых люминесцентных сигналов при многократном использовании тест-системы после ее предварительной температурной обработки.

Из представленных данных (Рисунок 4.12) также видно, что после предварительной температурной обработки данной тест-системы регистрируемые сигналы приобретают относительно высокий и постоянный уровень (314 ± 68 отн. ед.), количественно соответствующий 10 – 15 % от уровня первого сигнала тест-системы, не подвергавшейся температурной обработке.

4.6 Тест-система «полимерная матрица–брушит + люцифераза»

Известно, что фосфат кальция (брушит) применялся в качестве адсорбента для выделения бактериальной люциферазы (Бондарь и др., 1988). Это явилось предпосылкой для проверки возможности использования частиц брушита в создании индикаторной системы.

Фосфат кальция получали при смешивании эквимолярных растворов хлористого кальция и K/Na фосфатного буфера в соотношении 1 : 1 (объем : объем). Образовавшиеся нерастворимые хлопья брушита осаждали

центрифугированием при малых оборотах, удаляли супернатант и добавляли к осадку брушита водный раствор 5 % D-глюкозы. Полученный образец суспензии частиц брушита смешивали в соотношении 1 : 1 (объем : объем) с сефарозой, также находящейся в 5 % D-глюкозе. Полученную смесь плавили при инкубации в термостате до образования жидкого геля и наносили на стеклянную подложку, помещая её в расплавленную смесь. После высушивания нанесенной смеси подложку помещали на 15 минут в исходный белковый экстракт для иммобилизации люциферазы на поверхность матрицы.

Измерения активности полученной тест-системы проводили после её предварительной температурной обработки – для этого систему помещали на 15 секунд в кювету с водой, нагретой до 45 °С.

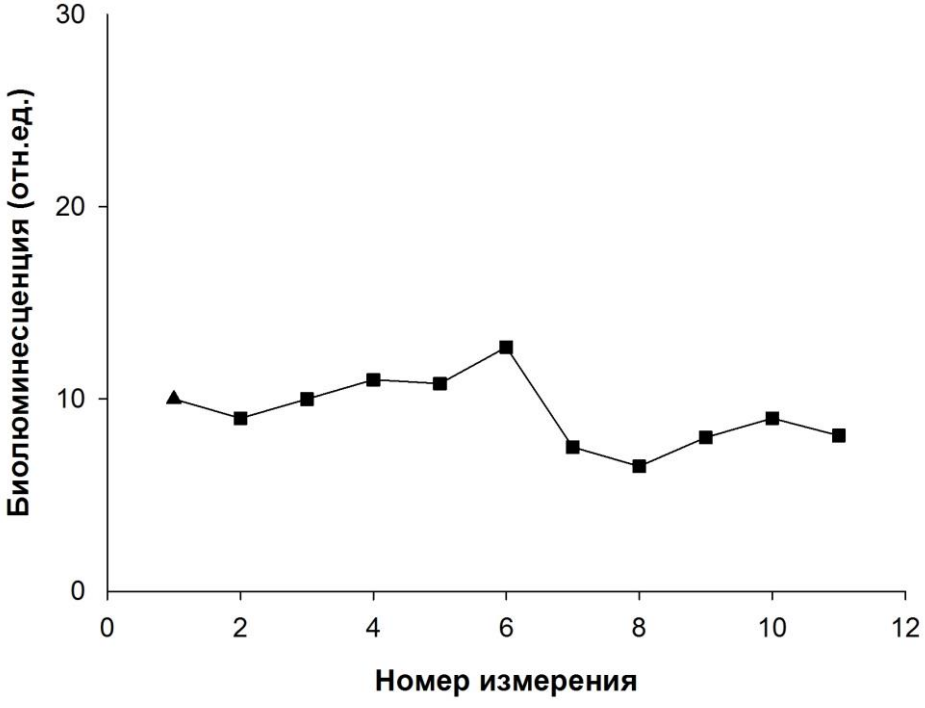


Рисунок 4.13 – Динамика интенсивности биолюминесцентных сигналов при многократном использовании тест-системы с индикаторным элементом брушит-люцифераза после ее предварительной температурной обработки.

Как видно из полученных данных (Рисунок 4.13), интенсивность регистрируемых сигналов тест-системы, полученной с использованием индикаторного комплекса брушит-люцифераза, свидетельствует о том, что частицы брушита вполне могут быть использованы для конструирования и создания индикаторных систем. При этом следует заметить, что величина сигналов, регистрируемых при использовании данной тест-системы, была на порядок ниже (≈ 10 отн. ед.), нежели при использовании тест-систем, индикаторным элементом которых является комплекс МНА-люцифераза (≈ 300 отн. ед.). Тем не менее, величина люминесцентных сигналов после температурной обработки тест-системы, сконструированной с использованием частиц брушита, является вполне достаточной для регистрации и дает возможность ее применения для микроанализа.

4.7 Тест-система «полимерная матрица + комплекс МНА-брушит-люцифераза»

Еще один вариант конструирования люминесцентной тест-системы состоял в создании тест-системы с использованием индикаторного элемента МНА-брушит-люцифераза.

Комплекс МНА-брушит получали добавлением к гидрозолю МНА при постоянном перемешивании в равных объемах эквимолярных растворов $CaCl_2$ и K/Na фосфатного буфера. Частицы наноалмаза при этом выполняли функцию зародышевых центров. К отмытому и ресуспендированному в воде осадку МНА-брушит добавляли раствор исходного белкового экстракта, содержащий люциферазу. МНА с адсорбированным белком осаждали центрифугированием, полученный осадок промывали для удаления примесей не адсорбированного белка и ресуспендировали в воде. Затем в полученную суспензию, содержащую комплекс МНА-брушит-люцифераза, на 15 минут помещали стеклянную подложку с предварительно закрепленной матрицей и проводили иммобилизацию комплекса.

Измерения активности люциферазы в данной тест-системе проводили после предварительной инактивации термолабильных молекул фермента – систему помещали на 15 секунд в кювету с водой, нагретой до 45 °С.

Как видно из полученных данных (Рисунок 4.14), величина люминесцентных сигналов, регистрируемых после температурной обработки тест-системы с индикаторным элементом МНА-брушит-люцифераза, как и в случае использования предыдущих тест-систем (см. выше), имеет относительно постоянный уровень с некоторой тенденцией к их снижению. При этом видно, что данная тест-система имеет какой же порядок величин регистрируемых люминесцентных сигналов (4,3 ± 0,6 онт. ед.), как и в случае использования системы с индикаторным элементом брушит-люцифераза (Рисунок 4.14).

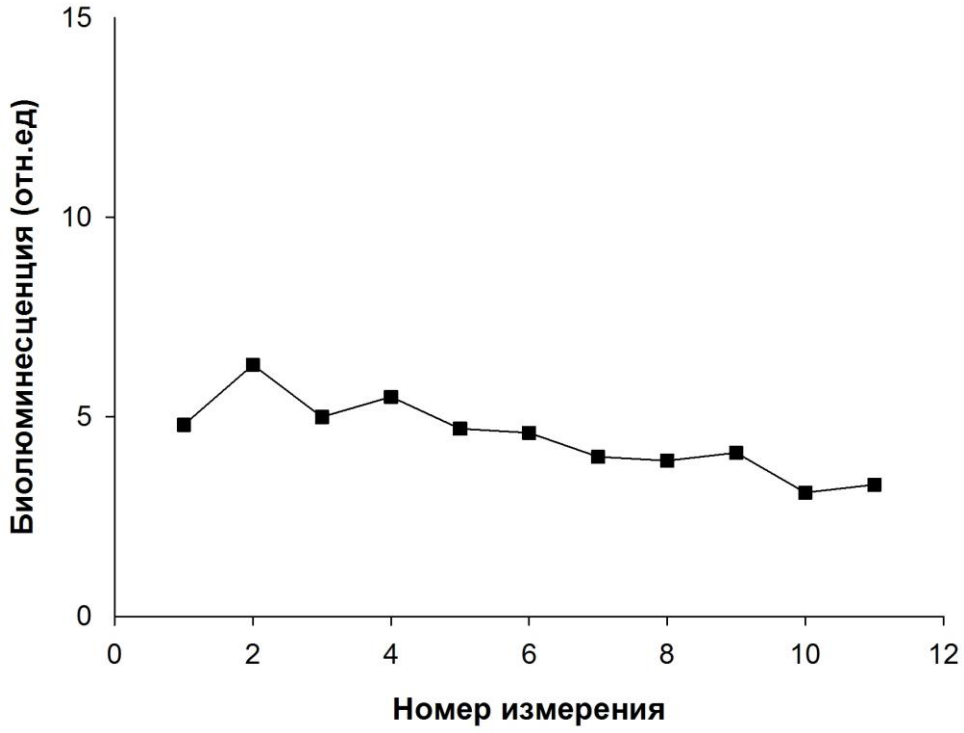


Рисунок 4.14 – Динамика интенсивности биолюминесцентных сигналов при многократном использовании тест-системы с индикаторным элементом МНА-брушит-люцифераза после ее температурной обработки.

4.8 Получение индикаторной тест-системы в высушенном виде

Известно, что наилучшая сохранность ферментов во времени достигается, когда белок находится в высушенном состоянии. Поэтому выделенный белок лиофильно высушивают, что позволяет в течение длительного периода времени (до нескольких лет) сохранить его ферментативную активность.

Однако, в ходе экспериментов по лиофильному высушиванию комплексов МНА-люцифераза было установлено, что люцифераза, адсорбированная на поверхности наночастиц алмаза, после лиофильного высушивания утрачивает свою ферментативную активность.

В связи с тем, что наличие тест-системы в высушенном состоянии является большим преимуществом при ее потенциальном использовании в практике, были проведены эксперименты по подбору условий сохранения активности системы при ее высушивании. Наилучший результат был получен при удалении воды из тест-системы с помощью ацетона с последующим его испарением при комнатной температуре. Для этого сконструированную тест-ситему на стеклянной подложке помещали на 30 секунд в раствор ацетона, который «экстрагировал» из нее воду, после чего система некоторое время высушивалась при комнатной температуре и помещалась для хранения в холодильник при 4 °С. Результаты по многоразовому использованию тест-системы, полученной по данному способу, приведены на Рисунке 4.15.

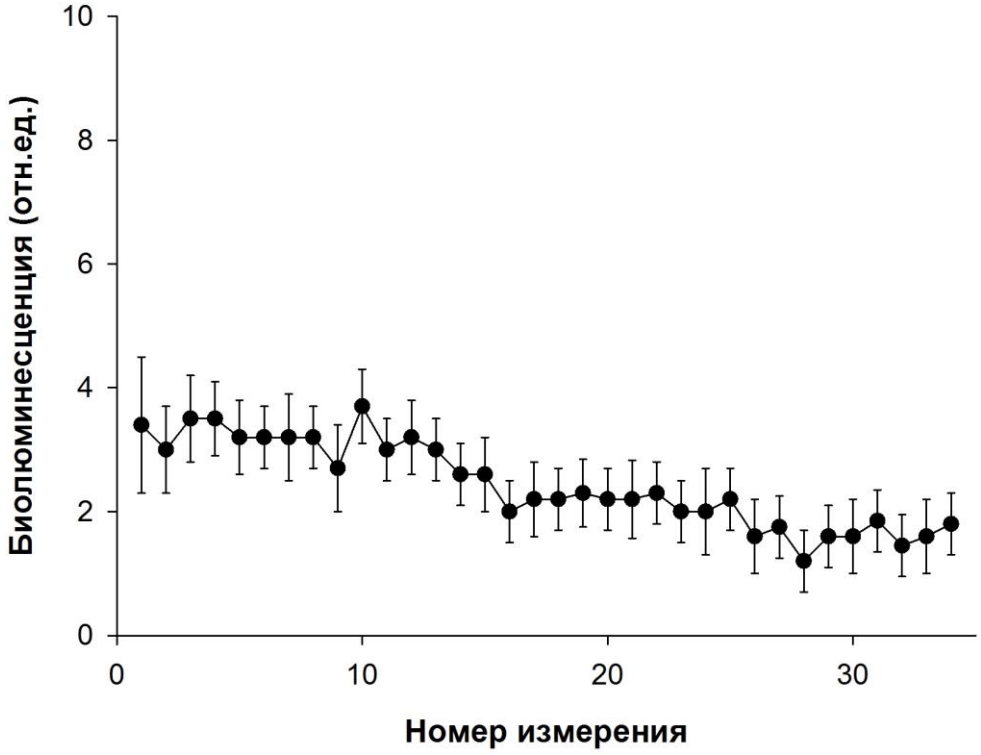


Рисунок 4.15 – Динамика интенсивности люминесцентных сигналов при многократном использовании тест-системы, полученной после ее высушивания с помощью ацетона.

Из представленных данных видно, что обработка тест-системы ацетоном с последующим его испарением на воздухе не приводит к необратимой утрате активности маркерного элемента и позволяет многократно (до 30 раз и более) использовать систему для микроанализа.

ГЛАВА 5 Конструирование и исследование свойств систем биохимического определения глюкозы и холестерина на основе МНА и ферментов

5.1 Концепция создания систем биохимического определения глюкозы и холестерина

Общий принцип работы систем биохимической диагностики, создаваемых на основе МНА и ферментов, представлен гипотетической схемой (Рисунок 5.1) и состоит в следующем. Определяемое вещество (аналит) трансформируется в цепи последовательных биохимических реакций, катализируемых ковалентно иммобилизованными на наночастицах ферментами $E_1 \rightarrow E_2 \rightarrow \ldots \rightarrow E_n$, в соответствующие продукты $P_1 \rightarrow P_2 \rightarrow \ldots \rightarrow P_n$. Финальный продукт ($P_n$) является окрашенным и легко выявляется спектральными методами анализа.

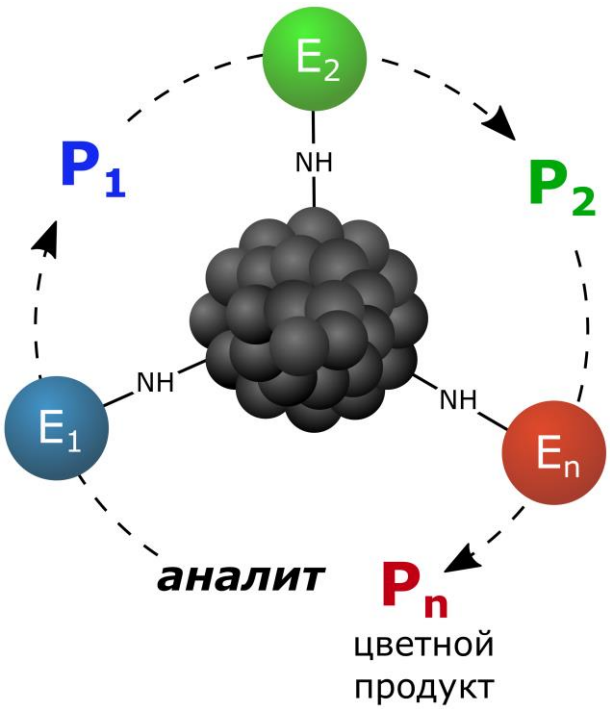


Рисунок 5.1 – Гипотетическая схема функционирования тест-систем биохимической диагностики, конструируемых на основе МНА и ферментов.

5.2 Ковалентная иммобилизация ферментов на поверхность МНА

Для конструирования модельных систем биохимической диагностики глюкозы и холестерина был использован метод ковалентной пришивки ферментов на частицы МНА, активированные бензохиноном. Известно, что для предотвращения денатурации биополимеров (например, белков) при их ковалентной иммобилизации на носителе, его поверхность предварительно активируют и это позволяет проводить последующее связывание биомолекул в относительно мягких условиях (Остерман, 1985). В результате реакции с химическим активатором на поверхности носителя формируются реактивные электрофильные группы, которые затем образуют ковалентные связи с нуклеофильными группами молекул иммобилизуемого биополимера, например, аминогруппами белка. Частным случаем такой реакции является предварительная активация носителя, содержащего поверхностные -OH группы, бензохиноном и последующая ковалентная пришивка белка на активированный носитель (Brandt et al., 1975; Mateescu et al., 1989). Такой метод широко используют при создании аффинных сорбентов, что позволяет в значительной мере сохранить специфическую активность иммобилизуемых белков (Остерман, 1985). Ранее было показано, что на поверхности МНА имеются гидроксильные группы (Gibson et al., 2009), поэтому в данной работе мы проводили ковалентную пришивку ферментов на наночастицы, предварительно активировав их бензохиноном. Методика активации МНА бензохиноном подробно изложена нами ранее (Purtov et al., 2010).

В работе было установлено (Рисунок 5.2), что весовое соотношение иммобилизуемых ферментов на стадии их пришивки на наночастицы имеет принципиальное значение для функциональной активности получаемого комплекса. При создании системы определения глюкозы было показано, что наибольшей эффективностью и, как следствие, большим уровнем образования выхода продукта обладает комплекс МНА-ферменты, полученный после иммобилизации глюкозооксидазы и пероксидазы при их весовых соотношениях

по белку 1 : 1. Существенно меньшую (примерно в 2 раза) активность проявляет комплекс, полученный в том случае, когда при ковалентной иммобилизации на частицы МНА один из ферментов значительно превалирует в весовом отношении.

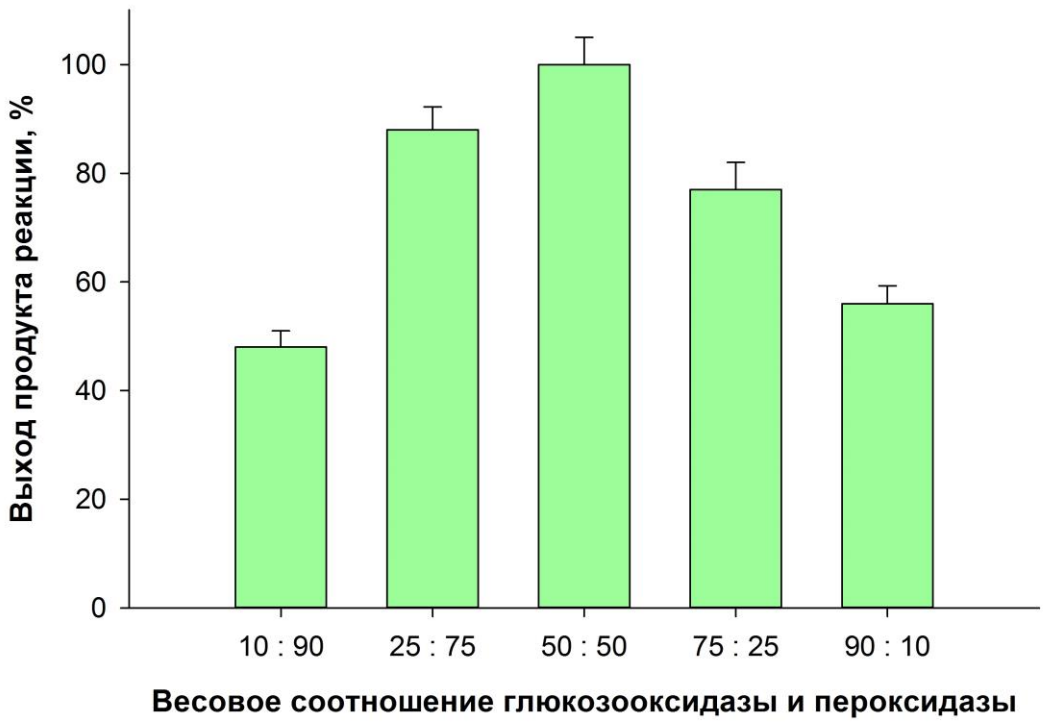


Рисунок 5.2 – Эффективность комплексов МНА-ферменты, полученных при разном весовом соотношении ферментов (глюкозооксидаза : пероксидаза) при их одновременной ковалентной пришивки на поверхность МНА.

При создании системы определения холестерина было показано, что эффективность комплекса МНА-ферменты (формирование окрашенного продукта реакции) была наиболее близка к максимальной при добавлении на стадии ковалентной пришивки 4 мг суммарного количества ферментов к 10 мг МНА (Рис 5.3). Исходя из этого, для дальнейшего конструирования биохимической системы определения холестерина использовали данное соотношение компонентов.

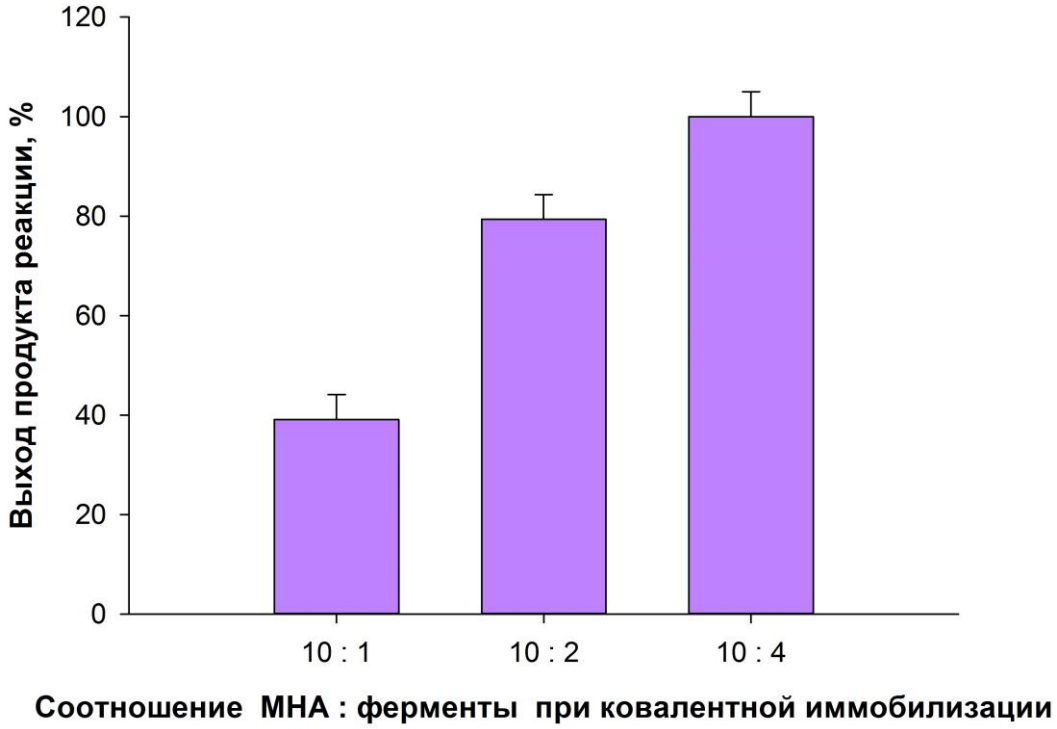


Рисунок 5.3 – Эффективность комплекса МНА-ферменты в зависимости от разного суммарного количества ферментов на стадии ковалентной пришивки.

В исследованиях было показано, что при выбранных условиях ковалентной иммобилизации ферментов на МНА (состав, молярность и pH среды; время, температура инкубации и скорость перемешивания суспензии; соотношение компонентов МНА – белок), на 1 мг функционализированных наночастиц удается ковалентно пришить до 70 мкг суммарного белка (ферментов) при создании системы для определения глюкозы и до 120 мкг белка при создании системы определения холестерина. Причем, было показано, что результаты определения белка спектральным методом и с помощью биуретовой реакции, использующей БСА в качестве стандарта, совпадают.

5.3 Исследование комплексов МНА-иммобилизованные ферменты

При создании модельных систем определения глюкозы и холестерина было установлено, что в обоих случаях ковалентно иммобилизованные на частицах МНА ферменты проявляют активность. Обе индикаторные системы (комплексы

МНА-ферменты) катализируют образование окрашенного продукта при добавках в реакционную смесь соответствующего аналита (холестерин или глюкоза, соответственно).

Было показано (Рисунок 5.4), что при использовании тест-систем при комнатной температуре наблюдается линейный выход продукта в интервале времени 5 – 40 минут. Следует заметить, что в отсутствие анализируемых веществ образования продукта системами не наблюдалось.

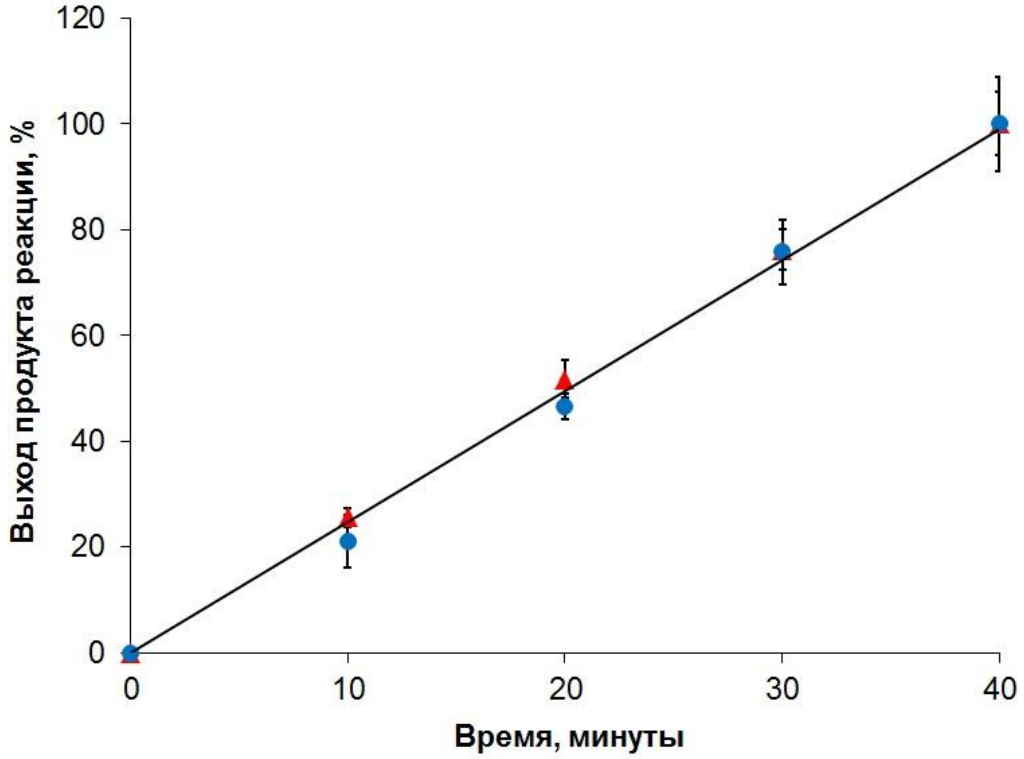


Рисунок 5.4 – Выход продукта реакции перекись водорода - 4-ААП - фенол, катализируемой тест-системами определения холестерина (треугольники) и глюкозы (кружки), в зависимости от времени. Данные нормированы на максимальные значения выхода продукта при измерениях глюкозы и холестерина, соответственно.

В ходе экспериментов было установлено, что скорости образования продуктов в ходе реакций, которые катализируются комплексомами МНА-ферменты, и реакций, катализируемые свободными ферментами, различаются (рисунки 5.5 и 5.6). Следует отметить, что в обоих случаях в реакции было использовано одинаковое суммарное количество белка (ферментов).

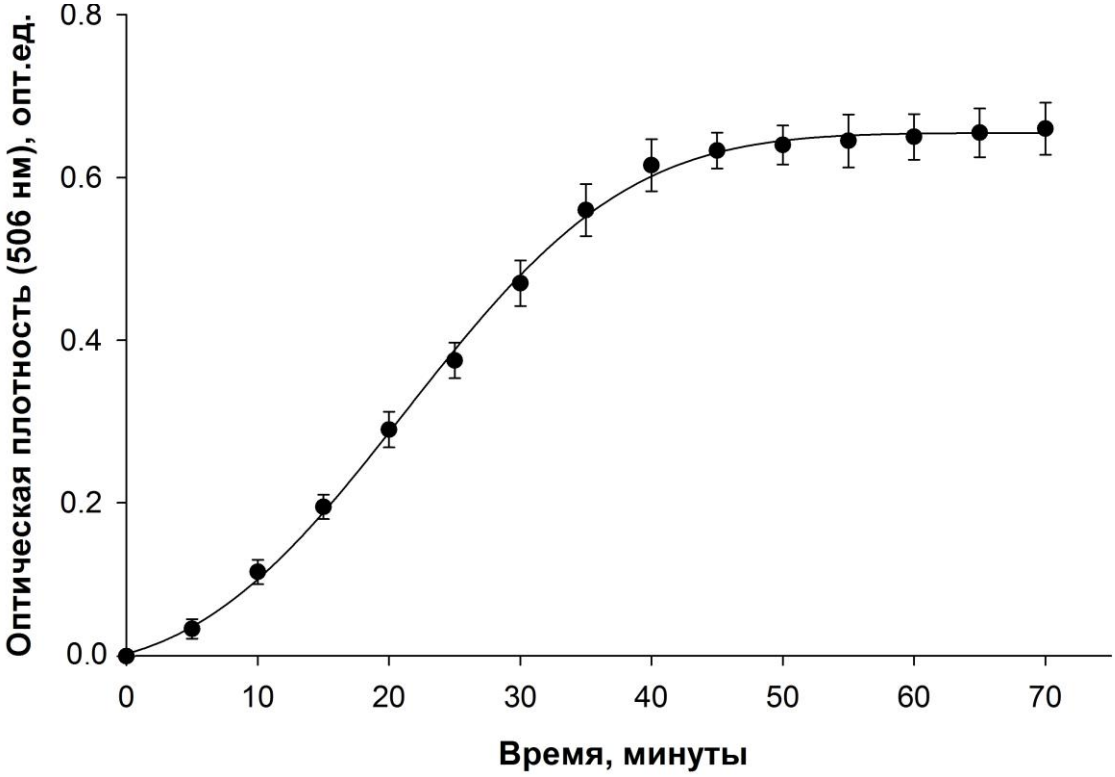


Рисунок 5.5 – Динамика образования продукта в реакции, катализируемой биферментным комплексом МНА-ферменты.

Из представленных данных видно, что прирост продукта идет гораздо быстрее в случае использования свободных ферментов, по сравнению с иммобилизованными. В тоже время, конечное содержание наработанного продукта (стационарный уровень оптической плотности) в обоих случаях является одинаковым, что свидетельствует об одинаковой эффективности обоих биферментных систем (свободные ферменты и ферменты, иммобилизованные на МНА).

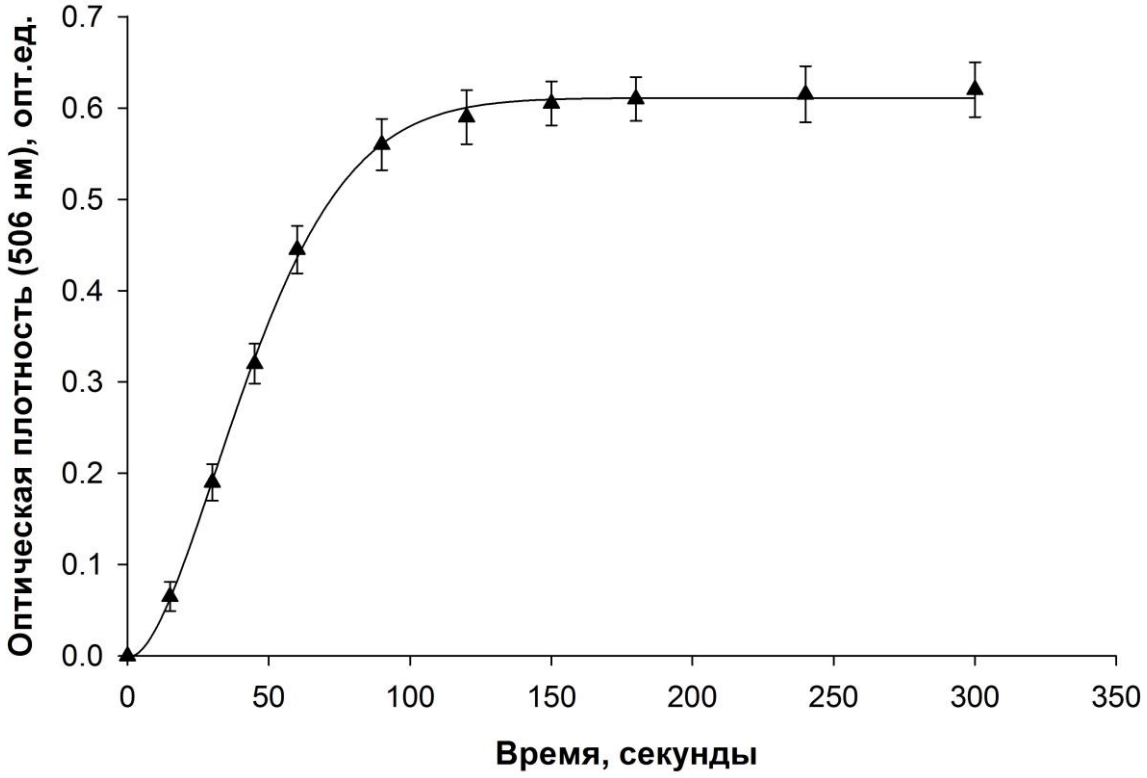


Рисунок 5.6 – Динамика образования продукта в реакции, катализируемой свободными ферментами.

Вероятное объяснение полученных данных может быть следующее. Более низкие скорости образования продукта в случае использования комплекса МНА-ферменты могут быть связаны с несколькими причинами: во-первых, со стерическими затруднениями, возникающими при взаимодействии субстрата (субстратов) с ферментами, иммобилизованными на носителе из-за различий в пространственной ориентации белковых молекул (прежде всего, активных центров) на поверхности кластеров МНА; во-вторых, из-за диффузионных процессов при движении субстратов к ферментам, иммобилизованным во внутреннем объеме кластеров, образованных группами наночастиц, и, в-третьих, нельзя исключить, что часть молекул обоих ферментов могли утратить свою каталитическую функцию в процессе иммобилизации на носителе. При этом, во всех указанных вариантах скорость образования продукта в единицу времени под

действием иммобилизованных на носителе ферментов будет снижаться, по сравнению со скоростью его наработки свободными ферментами. В то же время, финальный пул наработанного продукта при заданных концентрациях субстратов должен оставаться постоянным, что и подтверждается экспериментально (рисунки 5.5 и 5.6). Следует заметить, что высказанные выше предположения требуют более детального изучения и будут являться предметом дальнейших исследований.

Как показали эксперименты (Рисунок 5.7), обе диагностические системы (комплексы МНА-ферменты) могут функционировать в широком интервале температур.

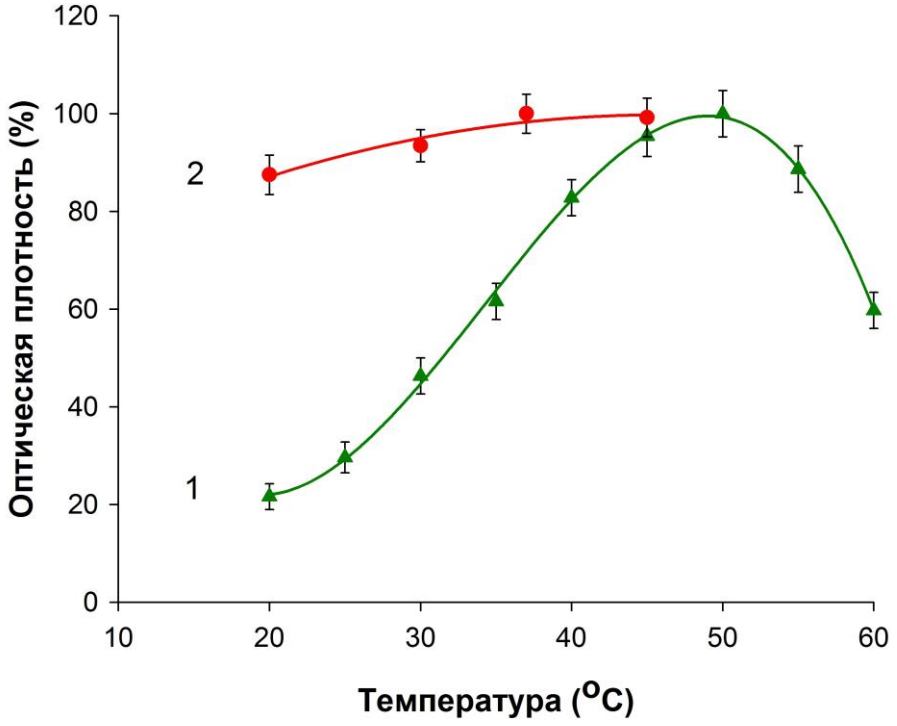


Рисунок 5.7 – Выход продукта реакции, катализируемой тест-системой определения холестерина (1) и глюкозы (2), в зависимости от температуры. Данные нормированы на максимальные значения выхода продукта при измерениях глюкозы и холестерина, соответственно.

Из представленных данных видно, что активность системы определения глюкозы незначительно возрастает в интервале температур 30 – 42 °С (повышение выхода продукта около 10 %), по сравнению с ее активностью при температуре 22 °С. В то же время, активность системы определения холестерина имеет температурный оптимум около 50 °С (Рисунок 5.7). При этой температуре выход продукта реакции существенно выше (примерно в 4 – 4.5 раза) по сравнению с его образованием при 20 °С. Тем не менее, при температуре 20 °С выход продукта вполне достаточен для его спектрального тестирования. Очевидно, что полученные данные (Рисунок 5.7) могут объясняться температурным оптимумом работы ферментов, входящих в состав диагностических систем.

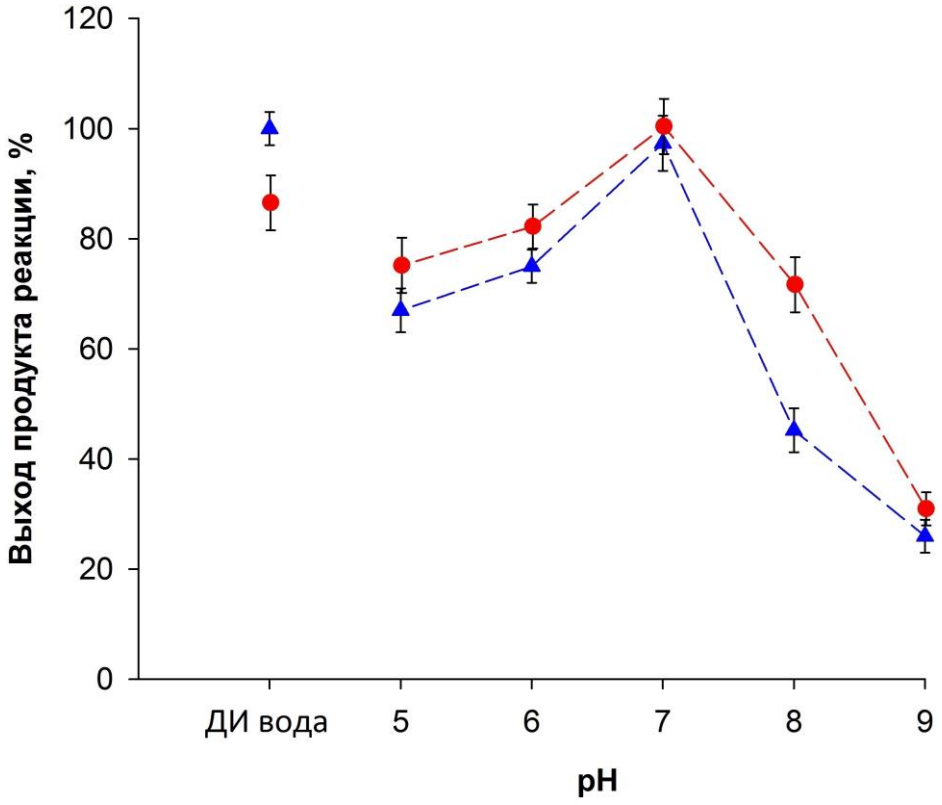


Рисунок 5.8 – Выход продукта реакции, катализируемой тест-системами определения холестерина (▲) и глюкозы (●), в зависимости от pH. Контроль – образование продукта, катализируемое тест-системами в деионизованной (ДИ) воде. Данные нормированы на максимальные значения выхода продукта при измерениях холестерина и глюкозы, соответственно.

В экспериментах установлено (Рисунок 5.8), что индикаторные комплексы МНА-ферменты могут функционировать в широком диапазоне pH, проявляя большую активность при слабокислых и нейтральных условиях среды. Как видно из представленных данных, обе диагностические системы столь же эффективно функционируют и в воде. Показано также, что системы определения холестерина и глюкозы могут эффективно функционировать и катализировать образование продукта в различных буферах, имеющих нейтральное значение pH. По крайней мере, это было продемонстрировано при использовании пяти разных буферов с концентрацией 20 мМ: фосфатного, аммоний ацетатного, бис-трис пропанового, натрий ацетатного и трисового (Рисунок 5.9).

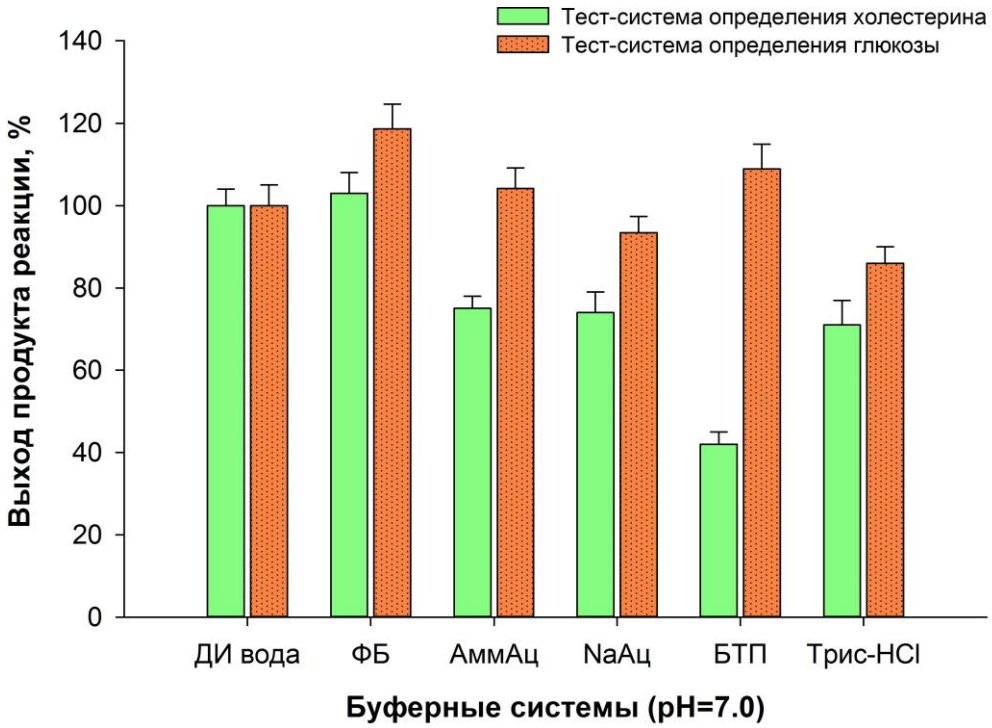
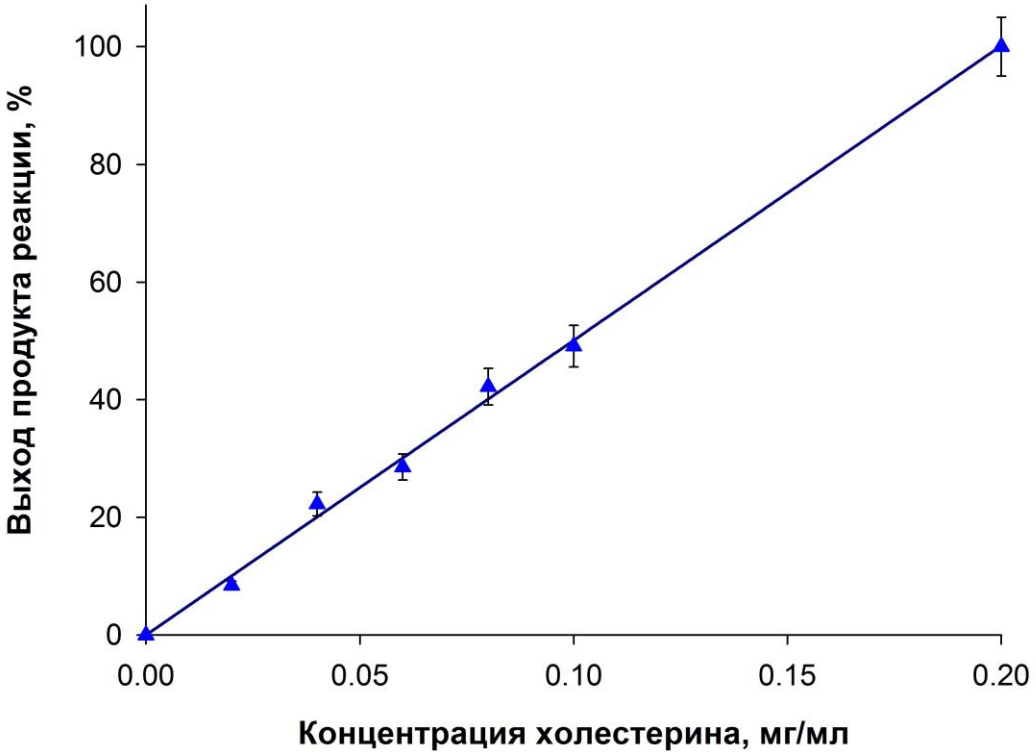


Рисунок 5.9 – Выход продукта реакции, катализируемой тест-системами определения холестерина (1) и глюкозы (2), в разных буферах с нейтральным значением pH (7.0): PB – фосфатный буфер, AmAc – аммоний ацетатный буфер, NaAc – натрий ацетатный буфер, BTP – бис-трис-пропановый буфер, Tris – трисовый буфер. Контроль – выход продукта, катализируемый тест-системами в деионизованной (ДИ) воде.

Было показано, что система индикации глюкозы обеспечивает практически одинаковый выход продукта почти во всех перечисленных буферах. При этом следует сказать, что в натрий ацетатном и трисовом буферах все-таки наблюдалось незначительное (около 5 – 10 % и 10 – 15 % соответственно) снижение выхода продукта по сравнению с его образованием в деионизованной воде. В то же время, система индикации холестерина оказалась более чувствительной к составу буфера (Рисунок 5.9). Видно, что выход продукта заметно снижается в аммоний ацетатном и натрий ацетатном (около 25 – 30 %) и, особенно, в бис-трис пропановом (до 50 – 60%) буферах, по сравнению с его выходом в деионизованной воде. В целом, представленные результаты свидетельствуют о том, что наиболее оптимальным для функционирования обеих систем является фосфатный буфер.

Было установлено, что созданные системы биохимической диагностики обеспечивают линейный выход продукта в широком интервале концентраций анализируемых веществ (Рисунок 5.10). При использовании системы определения холестерина это наблюдается в диапазоне низких (0.01 – 0.2 мг/мл) концентраций аналита. При этом система определения глюкозы обеспечивает линейный выход продукта в интервале концентраций глюкозы 0.01 – 1.5 мг/мл, который перекрывает ее физиологические значения в крови человека. Эти результаты имеют важное практическое значение с точки зрения возможности применения сконструированных тест-систем в медицинской диагностике физиологически важных веществ.



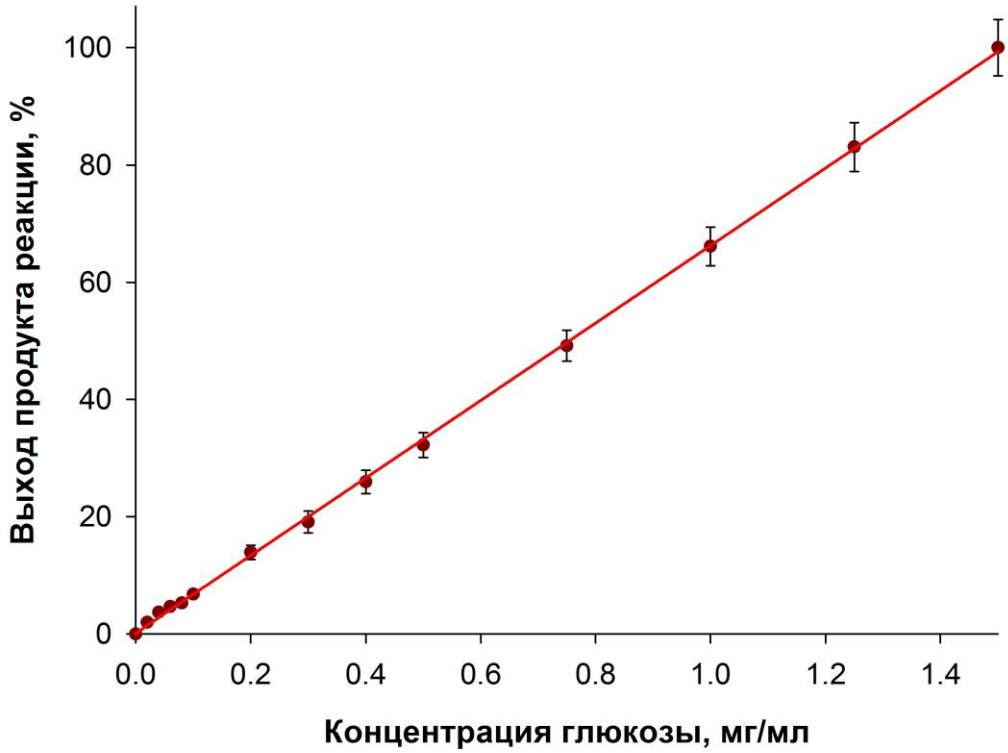


Рисунок 5.10 – Выход продукта реакции, катализируемый тест-системами МНА-ферменты, в зависимости от концентрации холестерина (А) и глюкозы (Б). Данные нормированы на максимальные значения выхода продукта при измерениях холестерина и глюкозы, соответственно.

В экспериментах продемонстрирована возможность многократного использования созданных тест-систем для определения холестерина и глюкозы *in vitro* (Рисунок 5.11).

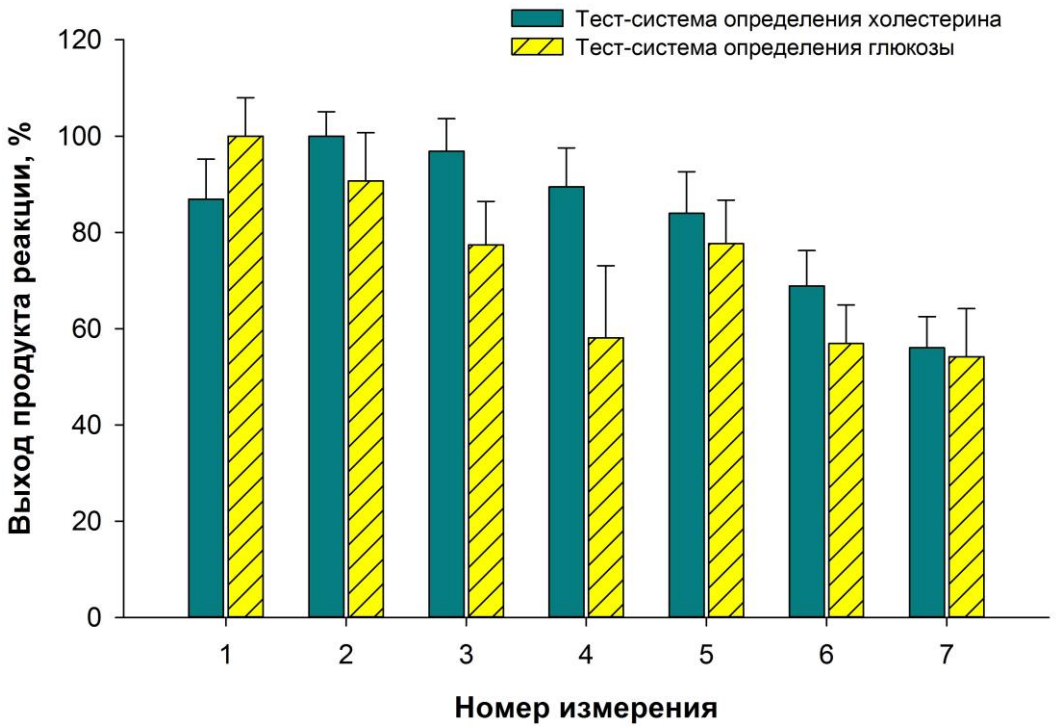


Рисунок 5.11 – Выход продукта реакции при многократном использовании тест-систем определения холестерина (1) и глюкозы (2). Данные нормированы на максимальные значения выхода продукта при измерениях холестерина и глюкозы, соответственно.

Как видно из представленных данных, при последовательных измерениях в обоих случаях наблюдается постепенное снижение выхода продукта реакции. Вероятно, наблюдаемые изменения могут быть связаны с частичной инактивацией ферментов при многократном использовании тест-систем. В частности, это может происходить на стадиях многократного ресуспендирования и осаждения комплексов МНА-ферменты центрифугированием при их отмывках от продукта реакции. Однако при этом следует заметить, что сконструированные

комплексы МНА-ферменты достаточно устойчивы. В пользу этого свидетельствует тот факт, что системы индикации холестерина и глюкозы проявляют функциональную активность, по крайней мере, в течение двух месяцев хранения в деионизованной воде при температуре 4 °С.

5.4 Оценка практического применения сконструированных систем в сыворотке крови *in vitro*

Оценку практического применения сконструированных биохимических систем (комплексов МНА-ферменты) проводили в экспериментах *in vitro* с использованием образцов сывороток крови человека для определения в них концентрации глюкозы и общего холестерина. Концентрацию глюкозы (и холестерина) определяли, измеряя интенсивность окраски образующегося продукта реакции и используя построенную калибровочную зависимость оптической плотности продукта от концентрации аналита. В параллельном эксперименте концентрации глюкозы и холестерина в этих же образцах определяли с помощью полифункционального автоматизированного биохимического анализатора Sapphire 400 (Niigata Mechatronics, Japan).

В результате сравнительных экспериментов было установлено, что сконструированные тест-системы применимы для определения общего холестерина и глюкозы сыворотке крови *in vitro*. Показано высокое совпадение данных при определении аналитов с использованием автоматизированного биохимического анализатора и диагностических систем МНА-ферменты, о чем свидетельствует высокий коэффициент корреляции между двумя методами тестирования (Рисунок 5.12). При определении глюкозы коэффициент корреляции составил 0.98, при определении холестерина – 0.94.

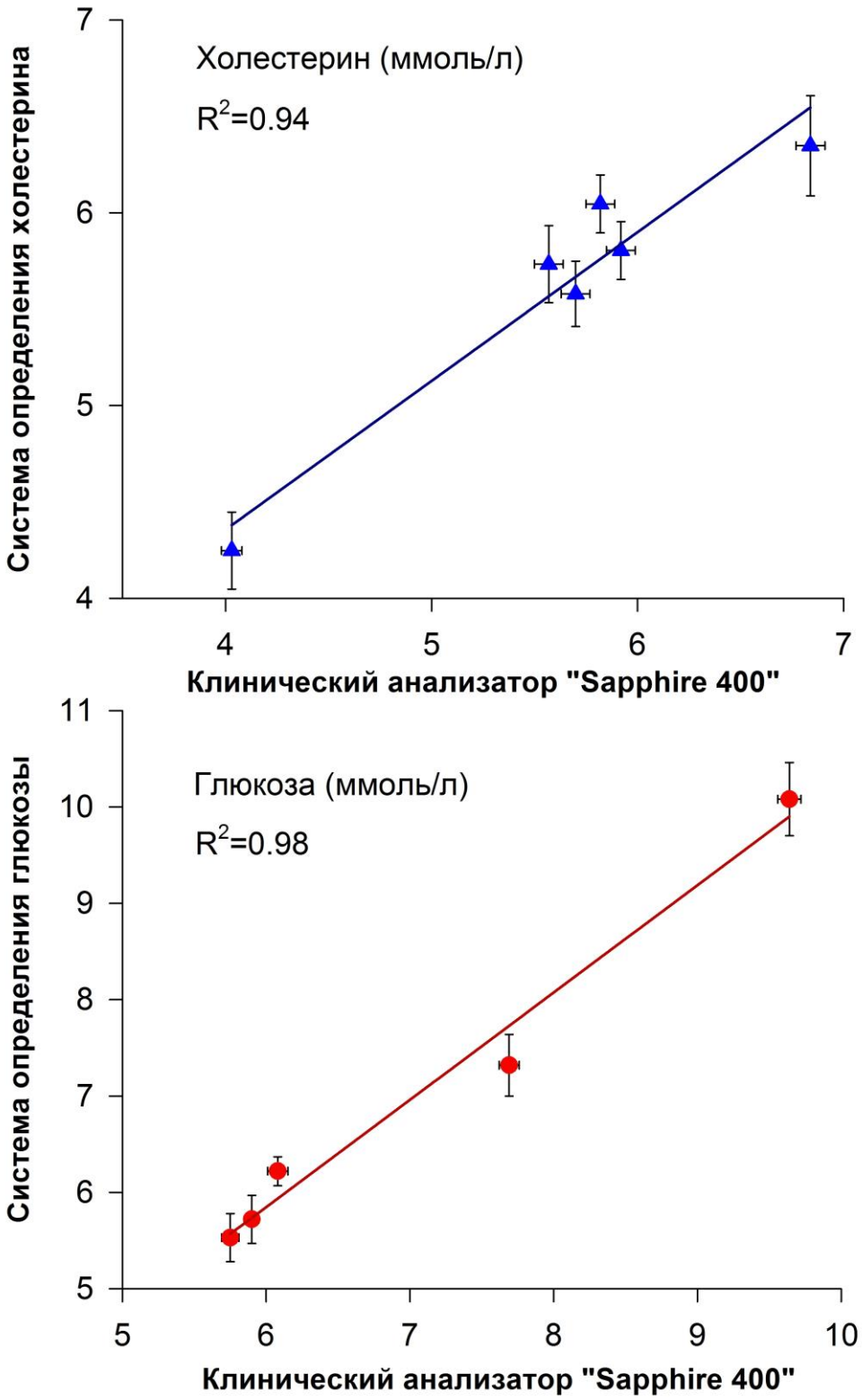


Рисунок 5.12 – Графики корреляций значений концентраций холестерина и глюкозы, полученных двумя независимыми методами – с помощью сконструированных тест-систем МНА-ферменты и с помощью биохимического анализатора «Sapphire 400».

Таким образом, в данном разделе продемонстрирована возможность применения МНА в создании систем биохимической диагностики физиологически важных веществ. С помощью ковалентной пришивки ферментов на активированные бензохиноном МНА сконструированы модельные системы определения холестерина и глюкозы. Установлено, что ковалентно иммобилизованные на поверхности наночастиц ферменты проявляют активность и катализируют образование окрашенного продукта в цепи последовательных ферментативных реакций. Показано, что полученные комплексы МНА-ферменты функционируют в широком диапазоне температур и pH, в деионизованной воде и буферах разного состава, обеспечивают линейный выход продукта в широком интервале концентраций анализируемых веществ, позволяют проводить многократное тестирование, длительное время сохраняют активность.

Исходя из этого, разработанные и сконструированные в данной работе многоразовые тест-системы биохимического диагностирования имеют несколько значительных преимуществ. Во-первых, использование полученных систем многократно позволяет в разы сократить расход ферментных препаратов, которые используются для проведения реакций однократно, что является выгодным преимуществом с экономической точки зрения. Во-вторых, сконструированные тест-системы позволяют проводить необходимые исследования в отсутствии специализированного и дорогостоящего оборудования, используя только спектрофотометром, который широко используется в лабораториях.

5.5. Оценка длительного хранения сконструированных тест-систем

В работе были проведены исследования направленные на выяснение наиболее оптимальных условий для длительного хранения сконструированных тест-систем биохимической диагностики. Поскольку полученные тест-системы представляют собой коллоидный раствор (гидрозоль) с комплексом МНА-ферменты, то для исследований по их длительному хранению были выбраны три потенциально возможных способа хранения. Первый – широко распространенный

способ высушивания для большинства белков (в том числе иммобилизованных) – лиофилизация. Второй – замораживание гидрозоля до минус 79 °С. Третий – хранение комплексов МНА-ферменты в виде гидрозоля при 4 °С.

Было установлено, что наиболее благоприятным способом хранения для сконструированных биохимических тест-систем является их хранение в виде гидрозоля при 4 °С. При таких условиях функциональная активность тест-систем практически не снижается при длительном хранении, по крайней мере, в течение 2 – 3 месяцев. При еженедельном отборе аликвоты из гидрозоля комплекса МНА-ферменты и запуске реакции на определение холестерина или глюкозы, флуктуации выхода продукта реакции, оптическая плотность которого регистрировалась спектрофотометрически, составляли не более 5 %.

При других способах хранения активность тест-систем существенно снижалась. При замораживании гидрозолей комплексов МНА-ферменты их активность снижалась на 20 %, а при лиофильном высушивании на 85 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленная работа посвящена изучению физико-химических и функциональных свойств частиц МНА и новых вариантов их применения как материала биотехнологического назначения в конструировании многоразовых ферментативных тест-систем.

В представленной работе продемонстрировано нетрадиционное применение наночастиц алмаза как материала биотехнологического назначения: как катализатора реакции между органическими соединениями и в качестве носителя для биомолекул (ферментов) в конструировании индикаторных и диагностических тест-систем многоразового использования.

В работе впервые установлено, что каталитический эффект МНА в реакции окислительного азосочетания (перекись водорода – 4-аминоантипирин – фенол) реализуется за счет поверхностных микропримесей ионов Fe и Cu. Полученные результаты расширяют представления о каталитической функции МНА в реакциях взаимодействия органических соединений и демонстрируют применимость частиц МНА при создании на их основе новых катализаторов и систем индикации для практического применения, например, в экологическом мониторинге для выявления в среде фенола и его производных.

В работе получены три индикаторные тест-системы многоразового использования с помощью иммобилизации ферментов на поверхность МНА путем физической адсорбции и ковалентной пришивки.

Сконструирована биолюминесцентная индикаторная тест-система посредством адсорбции светоизлучающего фермента люциферазы на поверхность МНА и закрепления полученного комплекса МНА-люцифераза на органической полимерной матрице. В результате проведенных экспериментов было выявлено нескольких механизмов связывания люциферазы при ее адсорбции с поверхностью наночастиц алмаза.

Сконструированы системы биохимического определения глюкозы и холестерина посредством одновременной ковалентной иммобилизации двух (глюкозооксидаза и пероксидаза) и трёх (холестеринэстераза, холестериноксидаза и пероксидаза) ферментов, соответственно, на поверхность МНА, активированную бензохиноном. В результате параллельных экспериментов установлено, что сконструированные тест-системы применимы для определения общего холестерина и глюкозы сыворотке крови *in vitro* – показано высокое совпадение данных при определении концентраций аналитов (глюкоза, холестерин) с помощью автоматизированного биохимического анализатора и диагностических систем МНА-ферменты.

ВЫВОДЫ

1. Впервые установлено, что каталитический эффект МНА в реакции окислительного азосочетания (перекись водорода – 4-аминоантипирин – фенол) реализуется за счет поверхностных микропримесей ионов Fe и Cu. Вероятно, в механизме катализа дополнительно могут участвовать химически активные кислород содержащие группы МНА. Выход цветного продукта катализируемой МНА реакции имеет линейную зависимость от концентрации фенола в диапазоне 0 – 10 мкг/мл. Полученные результаты свидетельствуют о применимости МНА для создания новых катализаторов взаимодействия органических соединений и систем экспресс индикации загрязнений окружающей среды соединениями фенола.

2. Сконструирована биолюминесцентная индикаторная тест-система посредством адсорбции светоизлучающего фермента люциферазы на поверхность МНА и закрепления полученного комплекса МНА-люцифераза на органической полимерной матрице. Адсорбированная на поверхности наночастиц люцифераза, по сравнению со свободным ферментом, обладает большей термостабильностью и проявляет бóльшую активность в различных буферных системах с нейтральным значением pH (7.0). Показана возможность многократного использования сконструированной тест-системы в люминесцентном микроанализе.

3. Сконструированы системы биохимического определения глюкозы и холестерина посредством одновременной ковалентной иммобилизации двух (глюкозооксидаза и пероксидаза) и трёх (холестеринэстераза, холестериноксидаза и пероксидаза) ферментов, соответственно, на поверхность МНА, активированную бензохиноном. Установлено, что в обоих случаях иммобилизованные ферменты проявляют свою функциональную активность и в присутствии соответствующего аналита катализируют цепь последовательных биохимических реакций, приводящих к образованию окрашенного продукта (хинонимин).

4. Показано, что полученные системы биохимической диагностики (комплексы МНА-ферменты) функционируют в широком диапазоне температур и pH, разных буферах с нейтральным значением pH (7.0) и деионизованной воде; обеспечивают линейный выход продукта в широком интервале концентраций определяемых аналитов; позволяют проводить многократное тестирование; проявляют функциональную активность в течение 2 – 3 месяцев хранения при 4 °С.

5. Установлено, что сконструированные тест-системы применимы для определения общего холестерина и глюкозы сыворотке крови *in vitro*. В параллельных экспериментах показано высокое совпадение данных при определении этих аналитов с помощью автоматизированного биохимического анализатора и диагностических систем МНА-ферменты: коэффициент корреляции при определении глюкозы составил 0.98, при определении холестерина – 0.94.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

4-ААП – 4-аминоантипирин (1-фенил-2,3-диметил-4-аминопиразолон)

МНА – модифицированные наноалмазы

НА – наноалмазы

НАД$^+$ – никотинамидадениндинуклеотид окисленный

НАД-Н – никотинамидадениндинуклеотид восстановленный

НАД (Ф) – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

ФМН – флавинмононуклеотид

ФМН-H_2 – флавинмононуклеотид восстановленный

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

H_2O_2 – перекись водорода

ЛИТЕРАТУРА

1. Аберкромби, Д. Аффинная хроматография: Методы / Д. Аберкромби, С. Алленмарк, С. Арамэ и др. ; под ред. П. Дин и др.; пер. с англ. Б. А. Клящицкого . – Москва : Мир, 1988 . – 278 с.
2. Альбертсон Пер-Оке. Разделение клеточных частиц и макромолекул / Пер-Оке Альбертсон. – М.: Мир. – 1974. – 381 с.
3. Белоусова, О.А. Промышленная экология / О.А. Белоусова, Л.В. Струкова, А.Н. Горшкова. – Екатеринбург: Изд-во ГОУ-ВПО УГТУ-УПИ. – 2006. – С. 15–21.
4. Березин, И.В. Практический курс химической и ферментативной кинетики / И.В. Березин, А.А. Клесов. М.: Изд-во МГУ. – 1976. – 320 с.
5. Березин, И.В. Иммобилизованные ферменты / И.В. Березин, Н.Л. Клячко, А.В. Левашев, К. Мартинек, В.В. Можаев, Ю.Л. Хмельницкий. – М.: Высшая школа, 1987. – 160 с.
6. Березин, И.В. Инженерная энзимология / И.В. Березин, А.А. Клесов, В.К. Швядас, Н.Н. Угарова, С.Д. Варфоломеев, А.И. Ярополов, Н.Ф. Казанская, Н.М. Егоров. – М.: Высшая школа, 1987а. – 144 с.
7. Бондарь, В.С. Синтез, скрининг и использование новых аффинных адсорбентов для получения высокоочищенных НАДФ(Н)-зависимых ферментов / В.С. Бондарь, П.В. Кузнецов, В.В. Межевикин. – Препринт №63Б Института физики СО АН СССР – Красноярск: ИФ СО АН СССР – 1987. – 35 с.
8. Бондарь, В.С. Получение препарата бактериальной люциферазы для биолюминесцентного анализа / В.С. Бондарь, Е.С. Высоцкий, В.В. Заворуев, В.В. Межевикин, А.А. Райбекас // Прикладная биохимия и микробиология. – 1988. – Т. 24. – С. 745–753.
9. Бондарь, В.С. Получение высокоочищенных НАДФ(Н)-зависимых ферментов из печени крыс с использованием НАДФ-

гидразидоадипоилоксипропил сефарозы / В.С. Бондарь, П.В. Кузнецов, В.В. Межевикин // Прикладная биохимия и микробиология. – 1988. – Т. 24. – С. 361–367.

10. Бондарь, В.С. Наноалмазы для биологических исследований / В.С. Бондарь, А.П. Пузырь // Физика твердого тела. – 2004. – Т. 46 (4). – С. 698–701.
11. Бондарь, В.С. Возможность и перспективы создания новых нанотехнологий на основе частиц детонационных наноалмазов: медико-биологический и технический аспекты / В.С. Бондарь, А.П. Пузырь // Конструкции из композиционных материалов. – 2005. – № 4. – С. 80–94.
12. Бондарь, В.С. Детонационный наноалмаз: создание новых материалов и технологий для выделения белков / В.С. Бондарь, А.П. Пузырь, К.В. Пуртов, О.А. Могильная, Г.А. Выдрякова, Н.А. Тюлькова, Э.К. Родичева, С.И. Медведева, А.Г. Дегерменджи, И.И. Гительзон // Российские нанотехнологии. – 2008. – Т. 3. – № 5–6. – С. 38–41.
13. Бондарь, В.С. Наноалмазы взрывного синтеза в биотехнологии / В.С. Бондарь // Тезисы докладов Международного научного семинара с молодежной школой «Биотехнология новых материалов и окружающая среда», Красноярск. – 2011. – С. 33–34.
14. Вудворт, Д. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / Д. Вудворт. – М.: Мир, 1988. – 215 с.
15. Гительзон, И.И. Светящиеся бактерии / И.И. Гительзон, Э.К. Родичева, С.Е. Медведева и др.; под общ. ред. Е.Н. Кондратьева. – Новосибирск: Наука. – 1984. – 277 с.
16. Дарбре, А. Практическая химия белка / А. Дарбре. – М.: Мир. – 1989. – 621 с.
17. Даванков, В.А. Лигандообменная хроматография / В.А. Даванков, Д. Навратил, Х. Уолтон. – М.: Мир, 1989. – 294 с.
18. Даниленко, В.В. Из истории открытия синтеза наноалмазов / В.В. Даниленко // Физика твердого тела. – 2004. – 46 (4). – С. 581–584.

19. Егоров, Н.С. Проблемы и перспективы / Н.С. Егоров, В.Д. Самуилов, А.В. Олескин. – М.: Высшая школа, 1987. – 159 с.
20. Еремин, А.Н. Соокисление фенола и 4- аминоантипирина, катализируемое полимерами и сополимерами пероксидазы корня хрена и глюкозооксидазы Penicillium funiculosum 46.1 / А.Н. Еремин, Т.В. Семашко, Р.В. Михайлова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42. – С. 452–461.
21. Еремина, А.О. Углеродные адсорбенты из древесных отходов в процессе очистки фенолсодержащих вод / А.О. Еремина, В.В. Головина, М.Ю. Угай, А.В. Рудковский // Химия растительного сырья. – 2004. – № 2. – С. 67–71.
22. Клесов, А.А. Ферментативный катализ / А.А. Клесов, И.В. Березин. – Т.1. – М.: Изд-во МГУ. – 1980. – 263 с.
23. Клесов, А.А. Ферментативный катализ / А.А. Клесов, И.В. Березин. – Т.2. – М.: Изд-во МГУ. – 1984. – 216 с.
24. Кочетов, Г.А. Практическое руководство по энзимологии / Г.А. Кочетов. – М.: Высшая школа. – 1981. – 272 с.
25. Кратасюк, В.А. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе / В.А. Кратасюк, И.И. Гительзон // Успехи микробиологии. – 1987. – Т. 21. – С. 3–30.
26. Кудряшева, Н.С. Физико-химические основы биолюминес-центного анализа: учебное пособие / Н.С. Кудряшева, В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекова – Красноярск: Красноярский государственный университет. – 2002. – 154 с.
27. Кулис, Ю.Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов / Кулис Ю.Ю. – Вильнюс: Изд-во Мокслас, 1981. – 200 с.
28. Лурье, Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод / Ю.Ю. Лурье. – М.: Химия, 1984. – 448 с.
29. Нидервайзер, А. Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков / А. Нидервайзер, Г. Патаки. – М.: Мир. – 1974. – 462 с.
30. Овчинников Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А. Овчинников. М.: Просвещение. – 1987. – 815 с.

31. Остерман, Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1985. – 536 с.
32. Петушков, В.Н. Биферментная система NADH:FMN-оксидоредуктаза – люцифераза из светящихся бактерий / В.Н. Петушков, Г.А. Кратасюк, Н.С. Родионова, А.М. Фиш, П.И. Белобров // Биохимия. – 1984. – Т. 49 (4). – С. 699–709.
33. Пузырь, А.П. Создание люминесцентного биочипа с использованием наноалмазов и бактериальной люциферазы / А.П. Пузырь, И.О. Позднякова, В.С. Бондарь // Физика твердого тела. – 2004. – Т. 46. – № 4. – С. 740–742.
34. Пуртов, К.В. Создание надмолекулярной структуры из частиц наноалмаза и обелина на двумерной подложке / К.В. Пуртов, В.С. Бондарь, А.П. Пузырь // Доклады РАН. – 2001. – Т. 380. – № 3. – С. 411–414.
35. Пуртов, К.В. Модельная система адресной доставки лекарственных веществ на основе наноалмазов / К.В. Пуртов, А.И. Петунин, А.П. Пузырь, А.Е. Буров, В.С. Бондарь // Российские нанотехнологии. – 2011. – Т. 6 (3–4). – С. 97–102.
36. Решетилов, А.Н. Нанобиотехнология и биосенсорные исследования / А.Н. Решетилов, А.М. Безбородов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44. – № 1. – С. 3–8.
37. Ронжин, Н.О. Выделение и очистка люциферазы в объеме с помощью наноалмазов детонационного синтеза / Н.О. Ронжин, К.А. Харин, А.П. Пузырь, В.С. Бондарь // НКСФ-2008: материалы научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых физиков НКСФ-XXXVII (2008). – Красноярск: Сибирский федеральный университет. – 2008. – С. 113–117.
38. Ронжин, Н.О. Наноалмазы в биотехнологии: применение для выделения белков и создания индикаторных тест-систем / Н.О. Ронжин, К.А. Харин, А.П. Пузырь, В.С. Бондарь // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2010. – Т. 3. – № 4. – С. 418–433.
39. Скоупс, Р. Методы очистки белков / Р. Скоупс. – М.: Мир. – 1985. – 358 с.

40. Ставер, А.М. Ультрадисперсные алмазные порошки, полученные с использованием энергии взрыва / А.М. Ставер, Н.В. Губарева, А.И. Лямкин, Е.А. Петров // Физика горения и взрыва. – 1984. – Т. 20. – С. 100–104.
41. Пат. 2073714 Российская Федерация, МПК С12 N1/21. Штамм бактерий *Escherichia coli* – продуцент бактериальной люциферазы / Б.А. Илларионов, Н.А. Тюлькова; опубл. 02. 20. 1997.
42. Пат. 2252192 Российская Федерация, МПК С01В 31/06. Способ получения наноалмазов взрывного синтеза с повышенной коллоидной устойчивостью / А.П. Пузырь, В.С. Бондарь; опубл. 20.05.2005. – Бюл. № 14.
43. Пат. 2252963 Российская Федерация, МПК С12Q1/66. Способ получения иммобилизованного многокомпонентного реагента для биолюминесцентного анализа / В.А. Кратасюк, Е.Н. Есимбекова; опубл. 27.05.2005. – Бюл. №15.
44. Пат. 2306258 Российская Федерация, МПК С01В 31/06. Синтетические алмазосодержащие вещества и способ их выделения / А.П. Пузырь, В.Б. Воробьев, В.С. Бондарь, Л.К. Попитченко; опубл. 20.09.2007. – Бюл. №26.
45. Ткачук, В.А. Нанотехнологии и медицина / В.А. Ткачук // Российские нанотехнологии. – 2009. – Т. 4. – С. 11–13.
46. Тривен, М. Иммобилизованные ферменты / М. Тривен. – М.: Мир, 1983. – 213 с.
47. Туркова, Я. Аффинная хроматография / Я. Туркова. – М.: Мир, 1978. – 471 с.
48. Угарова, Н.Н. Биолюминесценция и биолюминесцентный анализ / Н.Н. Угарова, Л.Ю. Бровко. – М.: МГУ. – 1981. – 138 с.
49. Франк, Л.А. Биолюминесцентный молекулярный микроанализ на основе Ca^{2+}-регулируемого фотопротеина обелина: автореф. дисс. докт. биол. наук. / Франк Людмила Алексеевна. – Красноярск: Ин-т физики СО РАН, 2009. – 41 с.
50. Чиганова, Г.А. Исследование поверхностных свойств ультрадисперсных алмазов / Г.А. Чиганова // Коллоидный журнал. – 1994. – Т. 56. – С. 266–268.

51. Яковлева, Г.Е. Ферменты в клинической биохимии / Г.Е. Яковлева. – Новосибирск: «Вектор-Бест». – 2005. – 44 с.
52. Allen, B. T. Impact of glucose self-monitoring on non-insulin-treated patients with type II diabetes mellitus. Randomized controlled trial comparing blood and urine testing / B. T. Allen, E. R. DeLong, J. R. Feussner // Diabetes Care. – 1990. – V. 13. – P. 1044–1050.
53. Amante, R. J. Cell-based bioluminescence screening assays / R. J. Amante, C. E. Badr // Bioluminescent Imaging. – 2014. – V. 1098. – P. 185–195.
54. Batory, M. Biological properties of carbon powders synthesized using chemical vapour deposition and detonation methods / M. Batory, D. Batory, J. Grabarczyk, W. Kaczorowski, B. Kupcewicz, K. Mitura, T. Nasti, N. Yusuf, P. Niedzielski // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2012. – V. 12. – P. 9037–9046.
55. Belkin, S. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants / S. Belkin // Current Opinion in Microbiology. – 2003. – V. 6. – P. 206–212.
56. Brandt, J. Covalent attachment of proteins to polysaccharide carriers by means of benzoquinone / J. Brandt, L.O. Andersson, J. Porath // Biochim. Biophys. Acta. – 1975. – V. 386. – P. 196–202.
57. Brodelius, P. Immobilized plant cells / P. Brodelius // Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology. – 1985. – P. 109–148.
58. Bucke C. Immobilized cells / C. Bucke // Phil. Truns. R Sot B. – 1983. – V. 300. – P. 369–389.
59. Casabuono, A.C. Comparison of micro-enzymatic and high performance anion exchange chromatography methods for the analysis of glucose in human serum / A.C. Casabuono, M.C. Moiron, C. Buchta, M.C. Perego, A.S. Couto // ARKAT USA. – 2005. – V. 12. – P. 243–252.
60. Caseroa, E. Laccase biosensors based on different enzyme immobilization strategies for phenolic compounds determination / E. Caseroa, M.D. Petit-Domingueza, L. Vazquezb, I. Ramirez-Asperillaa, A.M. Parra-Alfambraa, F. Parientea, E. Lorenzoa // Talanta. – 2013. – V. 115. – P. 401–408.

61. Dolmatov, V.Yu. Physical and chemical problems of modification of detonation nanodiamond surface properties / V.Yu. Dolmatov, T. Fujimura // NATO Sci. Ser. II: Math. Phys. Chem. – 2005. – V. 192. – P. 217–230.
62. Esimbekova, E. N. Application of Enzyme Bioluminescence in Ecology / E. N. Esimbekova, V. A. Kratasyuk, O. Shimomura // Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. – 2014. – V. 144. – P. 67–109.
63. Esimbekova, E. N. Bioluminescent enzymatic rapid assay of water integral toxicity / E. N. Esimbekova, A. M. Kondik, V. A. Kratasyuk // Environmental Monitoring and Assessment. – 2013. – V. 185. – I. 7. – P. 5909–5916.
64. Fontbonne, A. Is glucose self-monitoring beneficial in non-insulin-treated diabetic patients? Results of a randomized comparative trial / A. Fontbonne, B. Billault, M. Acosta et al. // Diabetes Metab. – 1989. – V. 15. – P. 255–260.
65. Frost, L.D. Glucose Assays Revisited: Experimental Determination of the Glucose Concentration in Honey / L.D. Frost // The Chemical Educator. – 2004. – V. 9. – P. 239–241.
66. Gemeiner, P. Materials for enzyme engineering / P. Gemeiner // Enzyme Engineering. – 1992. – P. 13–119.
67. Gibson, N. Colloidal stability of modified nanodiamond particles / N. Gibson, O. Shenderova, T.J.M. Luo, S. Moseenkov, V. Bondar, A. Puzyr, K. Purtov, Z. Fitzgerald, D.W. Brenner // Diamond and Related Materials. – 2009. – V. 18. – P. 620–626.
68. Goenka, S. Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering / S. Goenka, V. Sant, S. Sant // Journal of Controlled Release. – 2014. – V. 173. – P. 75–88.
69. Goldstein, L. Kinetic behavior of immobilized enzyme systems / L. Goldstein // Methods in Enzymology. – 1976. – V. XLIV. – P. 397–443.
70. Grobotllot, A. Immobilization of cells for application in the food industry / A. Grobotllot, D. K. Boadi, D. Poncelot, R. J. Neufeld // Critical Reviews in Biotechnology. – 1994. – V. 14. – P. 75–107.

71. Hastings, J. W. Total quantum flux of isotropic sources / J. W. Hastings, G. Weber // Journal of the Optical Society of America. – 1963. – V. 53. – P. 1410–1415.
72. Ho, D. Nanodiamonds: The intersection of nanotechnology, drug development, and personalized medicine / D. Ho, C.-H. K. Wang, E. K.-H. Chow // Science Advances. – 2015. – V. 1. – N. 7. – P. 1–14.
73. Illarionov, B.A. Recombinant obelin: cloning and expression of cDNA, purification and characterization as a calcium indicator / B.A. Illarionov, L.A. Frank, V.A. Illarionova, V.S. Bondar, E.S. Vysotski, J.R. Blinks // Meth. Enzymol. – 2000. – V. 305. – P. 223–249.
74. Kaur, R. Nanodiamonds as novel nanomaterials for biomedical applications: drug delivery and imaging systems / R. Kaur, I. Badea // International Journal of Nanomedicine. – 2013. – V. 8. – P. 203–220.
75. Keppy, N.K. Enzymatic Colorimetric Methods for the Analysis of Human Serum by UV-Visible Spectroscopy / N.K. Keppy, G. Bain, M.W. Allen. – Madison: Thermo Fisher Scientific, 2009.
76. Kierstan, M. P. J. Immobilization of proteins by noncovalent procedures: principles and applications / M. P. J. Kierstan, M. P. Coughlan // Protein Immobilization. – 1991. – P. 13–71.
77. Krueger, A. New carbon materials: biological applications of functionalized nanodiamond materials / A. Krueger // Chemistry – A European Journal. – 2008. – V. 14. – P. 1382–1390.
78. Krueger, A. The structure and reactivity of nanoscale diamond / Krueger A. // J. Mater. Chem. – 2008a. – V. 18. – P. 1485–1492.
79. Lad, A. Nanodevices for monitoring toxicological behavior of therapeutic agent / A. Lad, Y. K. Agrawal // Reviews in Nanoscience and Nanotechnology. – 2012. – V. 1 (3). – P. 217–227.
80. Lamanna, G. Multifunctionalized carbon nanotubes as advanced multimodal nanomaterials for biomedical applications / G. Lamanna, A. Battigelli, C. Menard-Moyon, A. Bianco // Nanotechnology Reviews. – 2012. – V. 1 (1). – P. 17–29.

81. Lopez-Moreno, M.L. X-ray absorption spectroscopy (XAS) corroboration of the uptake and storage of CeO(2) nanoparticles and assessment of their differential toxicity in four edible plant species / M.L. Lopez-Moreno, G. de la Rosa, J.A. Hernandez-Viezcas, J.R. Peralta-Videa, J.L. Gardea-Torresdey // J. Agr. Food Chem. – 2010. – V. 58. – P. 3689–3693.
82. Man, H.B. Nanodiamonds as Platforms for Biology and Medicine / H.B. Man, D. Ho // Journal of Laboratory Automation. – 2013. – V. 18 (1). – P. 12-18.
83. MacBeath, G. Protein microarrays and proteomics / G. MacBeath // Nat. Genet. – 2002. – V. 32. – P. 526–532.
84. Manjunathaa, R. An amperometric bienzymatic cholesterol biosensor based on functionalized graphene modified electrode and its electrocatalytic activity towards total cholesterol determination / R. Manjunathaa, G. S. Suresha, J.S. Melob, S.F. D'Souzab, T. V. Venkateshac // Talanta. – 2012. – V. 99. – P. 302–309.
85. Mateescu, M.-A. Ready to use p-benzoquinone-activated supports for biochemical coupling, with special applications for laccase immobilization / M.-A. Mateescu, G. Weltrowska, E. Agostinelli, R. Saint-Andre, M. Weltrowski, B. Mondovi // Biotechnol. Tech. – 1989. – V. 3. – P. 415–420.
86. Matuszewski, W. Graphite paste-based enzymatic glucose electrode for flow inject ion analysis / W. Matuszewski, M. Trojanowicz // Analyst. – 1988. – V. 113. – P. 735–738.
87. Messing, R. A. Adsorption and inorganic bridge formations / R. A. Messing // Methods in Enzymology. – 1976. – V. XLIV. – P. 148–169.
88. Metzler, D. E. Biochemistry. The Chemical Reactions of Living Cells. 2nd Edition / D. E. Metzler. – Waltham: Academic Press, 2003.
89. Mieszawska, A. J. Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease / A. J. Mieszawska, W. J. Mulder, Z. A. Fayad, D. P. Cormode // Molecular Pharmaceutics. – 2013. – V. 10 (3). – P. 831–847.

90. Mochalin, V. N. The properties and applications of nanodiamonds / V. N. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, Y. Gogotsi // Nature Nanotechnology. – 2012. – V. 7. – P. 11–23.
91. Nadifiyine, S. Amperometric Biosensor Based on Tyrosinase Immobilized on to a Carbon Black Paste Electrode for Phenol Determination in Olive Oil / S. Nadifiyine, M. Haddam, J. Mandli, S. Chadel, C.C. Blanchard, J.L. Marty, A. Amine // Analytical Letters. – 2013. – V. 46. – P. 1–44.
92. Niemeyer, C.M. Nanobiotechnology: Concepts, Applications and Perspectives / C.M. Niemeyer, C.A. Mirkin – Darmstadt: John Wiley & Sons, 2006. – 491 p.
93. Nikitin, M.P. Protein-assisted self-assembly of multifunctional nanoparticles / M.P. Nikitin, T.A. Zdobnova, S.V. Lukash, O.A. Stremovskiy, S.M. Deyev // PNAS. – 2010. – V. 107. – P. 5827–5832.
94. Nilsson, K. Methods for immobilizing animal cells / K. Nilsson // Trends Biotechnol. – 1987. – V. 5. – P. 73–78.
95. Phongphut, A. A disposable amperometric biosensor based on inkjet-printed Au/PEDOT-PSS nanocomposite for triglyceride determination / A. Phongphut, C. Sriprachuabwong, A. Wisitsoraat, A. Tuantranont, S. Prichanont, P. Sritongkham // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2013. – V. 178. – P. 501–507.
96. Poetz, O. Protein microarrays for antibody profiling: specificity and affinity determination on a chip / O. Poetz, R. Ostendorp, B. Brocks, J.M. Schwenk, D. Stoll, T.O. Joos, M.F. Templin // Proteomics. – 2005. – V. 5. – P. 2402–2411.
97. Porath, J. Metal chelate affinity chromatography – a new approach to protein fractionation / J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage // Nature (London). – 1975. – V. 258. – P. 598–599.
98. Puzyr, A.P. Physical and chemical properties of modified nanodiamonds / A.P. Puzyr, V.S. Bondar, A.A. Bukayemsky, G.E. Selyutin, V.F. Kargin // NATO Sci. Ser. II: Math. Phys. Chem. – 2005. – V. 192. – P. 261–270.

99. Puzyr, A.P. Nanodiamonds with novel properties: a biological study / A.P. Puzyr, A.V. Baron, K.V. Purtov, E.V. Bortnikov, N.N. Skobelev, O.A. Mogilnaya, V.S. Bondar // Diamond and Related Materials. – 2007. – V. 6. – P. 2124–2128.
100. Purtov, K.V. Nanodiamonds as carriers for address delivery of biologically active substances / K.V. Purtov, A.I. Petunin, A.E. Burov, A.P. Puzyr, V.S. Bondar // Nanoscale Res. Lett. – 2010. – V. 5. – P. 631–636.
101. Purtov, K.V. Detonation nanodiamonds as a base for design sensing and address delivery systems / K.V. Purtov, A.I. Petunin, E.S. Mamaeva, A.V. Baron, A.P. Puzyr, A.E. Burov, V.S. Bondar // Тезисы докладов Международного научного семинара с молодежной школой «Биотехнология новых материалов и окружающая среда», Красноярск. – 2011. – С. 30–32.
102. Raza, M. A. Graphite nanoplatelets produced by oxidation and thermal exfoliation of graphite and electrical conductivities of their epoxy composites / M. A. Raza, A. Westwood, A. Brown, N. Hondow, C. Stirling // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2012. – V. 12. – P. 9259–9270.
103. Rudge, J. Thermal stability properties of immobilized creatine kinase / J. Rudge, G. F. Bickerstaff // Biochem. Sot. Trans. – 1984. – V. 12. – P. 311–312.
104. Say, J. M. Luminescent nanodiamonds for biomedical applications / J. M. Say, C. van Vreden, D. J. Reilly, L. J. Brown, J. R. Rabeau, N. J. C. King // Biophysical Reviews. – 2011. – V. 3. – P. 171–184.
105. Schneider, D. Hypercalciuna in children with renal glycosuria: evidence of dual renal tubular reabsorptive defects / D. Schneider, F. E. Gauthier, H. Trachtman // J. Pediatr. – 1992. – V. 121. – P. 715.
106. Schrand, A. M. Nanodiamond Particles: Properties and Perspectives for Bioapplications / A. Schrand, S. A. C. Hens, O. A. Shenderova // Solid State Materials Sciences. – 2009. – V. 34. – P. 18–74.
107. Scott, D. Bioluminescence and Its Impact on Bioanalysis / D. Scott, E. Dikici, M. Ensor, S. Daunert // Annual Review of Analytical Chemistry. – 2011. – V. 4. – P. 297–319.

108. Srere, P. A. Functional groups on enzymes suitable for binding to matrices / P. A. Srere, K. Uyeda // Methods in Enzymology. – 1976. – V. XLIV. – P. 11–19.
109. Starostina, E. G. Effectiveness and cost-benefit analysis of intensive treatment and teaching programmes for type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus in Moscow — blood glucose versus urine glucose self-monitoring / E. G. Starostina, M. Antsiferov, G. R. Galstyan et al. // Diabetologia. – 1994. – V. 37. – P. 170–176.
110. Stoll, D. Protein microarrays: applications and future challenges / D. Stoll, M.F. Templin, J. Bachmann, T.O. Joos // Curr. Opin. Drug. Discov. Devel. – 2005. – V. 8. – P. 239–252.
111. Tan, C. Synthesis and applications of graphene-based noble metal nanostructures / Tan C., Huang X., Z hang H. // Materials Today. – 2013. – V. 16. – P. 29–36.
112. Toher, J. Stability properties of two supports for immobilization of enzymes / J. Toher, A. M. Kelly, G. F. Bickerstaff // Biochem. Sot. Trans. – 1990. – V. 18. – P. 313–314.
113. Wang, Z. Anti-microbial activities of aerosolized transition metal oxide nanoparticles / Z. Wang, Y.H. Lee, B. Wu, A. Horst, Y. Kang, Y.J. Tang, D.R. Chen // Chemosphere. – 2010. – V. 80. – P. 525–529.
114. Warren, E.N. Development of a protein chip: a MS-based method for quantitation of protein expression and modification levels using an immunoaffinity approach / E.N. Warren, P.J. Elms, S.E. Parker, C.H. Borchers // Anal. Chem. – 2004. – V. 76. – P. 4082–4092.
115. Wegrzyn, G. How do marine bacteria produce light, why are they luminescent, and can we employ bacterial bioluminescence in aquatic biotechnology / G. Wegrzyn, A. Czyz // Oceanologia. – 2002. – V. 44. – № 3. – P. 291–305.
116. Werner, M. Operations characteristics of analytical methods: comments and application to cholesterol assay / M. Werner, D. Williams, L.P. Skendzel et al. – Chicago: American Society of Clinical Pathologists, 1979.

117. Woodward, J. Immobilized enzymes: adsorption and covalent coupling / J. Woodward // Immobilized Cells and Enzymes. A Practical Approach. – 1985. – P. 3–l7.

118. Yang, Z. Single-enzyme nanoparticles based urea biosensor / Z. Yang, C. Zhang // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2013. – V. 188. – P. 313–317.