

## BIOSENSORS

S. D. VARFOLOMEEV

*Biosensors are the bio-electronic devices which use the biomacromolecules and cells for “recognition” of molecules and transform the information about molecules and their concentrations into electric signal. Principles of construction and action of biosensors are described. The enzyme electrodes and cellular biosensors are discussed in more details.*

**Обсуждаются принципы действия и возможности биосенсоров – новых аналитических устройств, использующих биологические материалы для “узнавания” молекул и дающих информацию об их присутствии и количестве в виде электрического сигнала. Более детально рассмотрены ферментные электроды и клеточные биосенсоры.**

## БИОСЕНСОРЫ

С. Д. ВАРФОЛОМЕЕВ

Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова

В последнее десятилетие возникли новые контакты на первый взгляд между очень далекими областями: электроникой и биохимией. Их взаимное проникновение друг в друга создало новую сферу интересов науки – биоэлектронику. Первым шагом в этой области было возникновение новых устройств для анализа и переработки информации, получивших название биосенсоров. Биосенсоры рассматриваются как первое поколение биоэлектронных устройств.

Что же такое биосенсоры? Как они устроены? Как работают? Что могут? Постараемся ответить на эти вопросы. Биосенсоры – это аналитические устройства, использующие биологические материалы для “узнавания” определенных молекул и выдающие информацию об их присутствии и количестве в виде электрического сигнала.

Идея создания такого рода устройств существует уже около 30 лет. Впервые ее высказали, по-видимому, Кларк и Лионс в 1967 году [1]. Идея Кларка состояла в использовании ферментного электрода, то есть электрохимического датчика с иммобилизованным на его поверхности ферментом. За прошедшие десятилетия эта идея получила достаточное развитие. Создано и исследовано много систем, некоторые получили апробирование и промышленную реализацию.

Большинство биосенсоров ориентированы на анализ биологических жидкостей. Действительно, например, в крови находятся тысячи различных соединений. Задача заключается в том, чтобы быстро и эффективно (количественно) определить концентрацию нужного соединения, например глюкозы. Для людей, страдающих диабетом, это жизненно важный клинический анализ. Биосенсоры обеспечивают такую возможность.

**Принципы конструирования биосенсоров.** Любой биосенсор состоит из двух принципиальных функциональных элементов: биоселектирующей мембраны, использующей различные биологические структуры, и физического преобразователя сигнала (трансдюсера), трансформирующего концентрационный сигнал в электрический. Для считывания и записи информации используют электронные системы усиления и регистрации сигнала. В качестве биоселектирующего материала используют все типы биологических структур: ферменты, антитела, рецепторы, нуклеиновые кислоты и даже живые клетки (рис. 1).

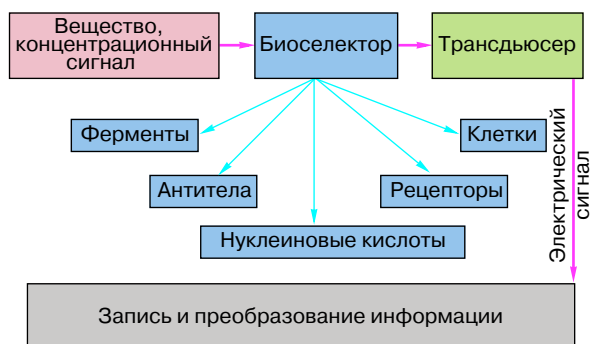


Рис. 1. Принципиальная схема биосенсора

Трансдьюсерами могут быть электрохимические преобразователи (электроды), различного рода оптические преобразователи, гравитационные, калориметрические, резонансные системы. Все виды биоселектирующих элементов можно комбинировать с различными трансдьюсерами. Это создаст большое разнообразие различных типов биосенсоров. В статье невозможно сколь-нибудь подробно рассмотреть все имеющиеся в настоящее время типы биосенсоров. Наибольшее развитие получили ферментные и клеточные биосенсоры.

## БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТОВ

Ферментативный катализ обеспечивает биоселектирующими возможностями основную массу современных биосенсоров. Сопряжение ферментативно-каталитических и электрохимических реакций, происходящих на электропроводящих материалах, погруженных в раствор электролита, позволило разработать много биосенсоров для определения глюкозы, аминокислот, молочного сахара, пирувата, мочевины и других метаболитов.

Первая, предложенная Кларком система основана на электроде, измеряющем в диффузионно-контролируемом режиме количество поглощенного кислорода. Было применено большое число оксидаз, использующих кислород для селективного окисления углеводов, аминокислот, органических кислот.

Наиболее удобно проводить измерения на ферментных электродах в амперометрическом режиме, то есть измерять силу тока (поток электронов) через поверхность электрода. Сила тока как скорость реакции может быть однозначно связана с концентрацией измеряемого компонента.

Простейший случай в конструировании ферментного биосенсора реализуется при условии, что либо субстрат, либо продукт ферментативной реакции электрохимически активны, то есть способны быстро и желательно обратимо окисляться или восстанавливаться на электроде при наложении на него соответствующего потенциала. Например, в био-

сенсоре на глюкозу с участием глюкозооксидазы используется следующая реакция:

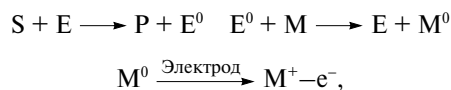


Соответственно электрохимическая детекция процесса может быть организована путем регистрации тока восстановления кислорода или перекиси водорода. Оба случая реализованы на практике. В амперометрических биосенсорах поток электронов через поверхность датчика линейно связан с концентрацией анализируемого вещества в растворе.

При адсорбции ферментов на твердых поверхностях (металлы, керамика, полимеры) они, как правило, сохраняют свою структуру и каталитическую активность. Фермент в режиме амперометрического биосенсора проявляет электрокаталитическую активность, то есть ускоряет процесс обмена электронами между субстратом и электродом.

Электрокаталитический транспорт электронов может быть осуществлен несколькими принципиально различными путями (рис. 2).

1. Перенос электронов протекает с помощью диффузионно-подвижного промежуточного низкомолекулярного переносчика электронов – медиатора. Схему процесса можно представить в виде



где E и E<sup>0</sup> – окисленная и восстановленная формы активного центра фермента; M и M<sup>0</sup> – окисленная и восстановленная формы медиатора.

Медиатор должен быть достаточно специфическим субстратом фермента и быть электрохимически активным на электроде из данного материала. Медиаторный механизм транспорта электрона достаточно

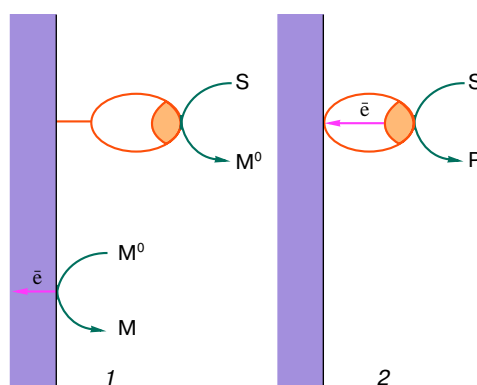


Рис. 2. Механизмы переноса электрона между активным центром фермента и электродом: 1 – медиаторный перенос; 2 – прямой перенос

широко используется для проведения электрохимических ферментативных реакций.

2. Происходит прямой электрокаталитический перенос электронов между электродом и активным центром фермента. Например, в атмосфере кислорода в присутствии медьсодержащей оксидазы — лакказы из *Polyporus versicolor*, сорбированной на электродах из различных материалов, устанавливается потенциал, близкий к термодинамически равновесному потенциалу кислорода. При этом имеет место стадия переноса электронов из электрода на активный центр фермента. Описано и электрокаталитическое восстановление пероксида водорода с помощью иммобилизованной пероксидазы, протекающее по такому же механизму.

3. При включении ферментов в органические полупроводники (органические металлы) можно наблюдать перенос электронов между активным центром фермента и доменами в полупроводнике. Все эти механизмы транспорта электронов активно используются при конструировании биосенсоров.

Если медиаторный перенос электрона — достаточно традиционный путь сопряжения электрохимической и ферментативной реакций, то прямой перенос, в котором фермент играет роль истинного электрокатализатора, представляет большой интерес. Остановимся на этом более подробно.

Впервые явление биоэлектрокатализа с участием прямого переноса электронов электрод — активный центр фермента было обнаружено и исследовано при изучении реакции электрохимического восстановления кислорода с участием медьсодержащей оксидазы — лакказы [2, 3]. В классической электрохимии электровосстановление кислорода — одна из наиболее сложных проблем. Известно, что равновесный потенциал окисления—восстановления пары  $O_2/H_2O$ , равный 1,23 В, устанавливается лишь на предварительно специально обработанной платине и в особо чистых растворах. В то же время известны ферменты, которые активно восстанавливают кислород по четырехэлектронному механизму до воды без промежуточного образования в растворе пероксида водорода. Лакказа является медьсодержащим ферментом, осуществляющим четырехэлектронное восстановление кислорода при использовании в качестве донора различных ароматических аминов и фенолов. В активный центр фермента входят четыре иона меди, осуществляющие координированное восстановление кислорода.

Известно, что электровосстановление кислорода в нейтральных или слабокислых растворах на угольных материалах протекает со значительным перенапряжением. При введении в систему лакказы в незначительных количествах ( $10^{-9}$  М) было замечено существенное смещение стационарного потенциала в область положительных значений и ускорение электровосстановления кислорода.

Наблюдаемые эффекты не зависят от природы электрода. Электрохимические измерения проводили на электродах из сажи, пирографита, стеклоуглерода или золота. Иммобилизацию лакказы осуществляли адсорбционным способом непосредственно на электрод. В присутствии кислорода и лакказы наблюдалось увеличение потенциала для всех исследуемых электродов. Максимальное значение потенциала +1,207 В, близкое к равновесному потенциалу кислородного электрода, устанавливалось на электродах из сажи, которые предварительно были выдержаны в растворе лакказы ( $10^{-5}$  М) в течение суток.

Адсорбция фермента на электродах из сажи практически необратима. После иммобилизации электрод сохраняет каталитические свойства при отсутствии лакказы в растворе. Ферментативная природа электрокатализа была доказана специфическим ингибированием электрокатализа фторид- и азид-ионами, инактивацией фермента прогреванием, сопоставлением рН-зависимости электрокаталитических эффектов и каталитической активности в реакции окисления феррицианид-иона кислородом.

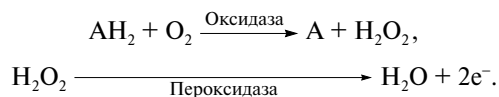
Таким образом, наблюдаемый электрохимический процесс на электроде с иммобилизованной лакказой определяется реакцией четырехэлектронного восстановления кислорода до воды



Кислородные электроды на основе иммобилизованной лакказы достаточно стабильны. Прямой электрокаталитический механизм переноса электронов обнаружен и исследован для лакказы, пероксидазы, гидрогеназы.

При конструировании биосенсоров наибольшее применение нашел феномен электровосстановления перекиси водорода с помощью иммобилизованной пероксидазы. Приведем несколько примеров.

**Определение ряда ключевых метаболитов.** Многие ферменты осуществляют оксидазную реакцию с различными веществами (глюкоза, аминокислоты) с образованием перекиси водорода. В этом случае пероксидазный электрод используется для трансформации концентрационного сигнала в электрическую форму. При совместной иммобилизации двух ферментов — оксидазы и пероксидазы проходят следующие процессы:

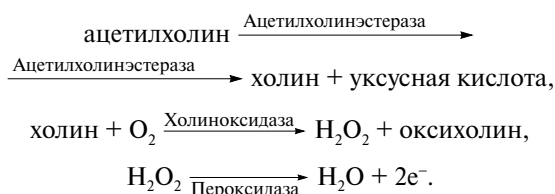


В электрокаталитическом режиме

В условиях, когда лимитирующей является первая стадия, величина тока линейно связана с концентрацией метаболита  $AH_2$ .

**Определение супероксидов и боевых отравляющих веществ.** Большая группа фосфоорганических соединений выступает в роли сильных ядов, блокируя в центральной нервной системе фермент

ацетилхолинэстеразу. По аналогичному механизму действуют большинство пестицидов. Были разработаны биосенсоры для детекции такого рода соединений с необходимой высокой чувствительностью. Ферментативные реакции, которые использованы для этих целей, выглядят следующим образом:



В электрокаталитическом режиме

Ингибитор (зарин, зоман,  $V_x$ ) блокирует активность ацетилхолинэстеразы, в конечном итоге уменьшая пероксидазный электрокаталитический ток через поверхность электрода. Чувствительность биосенсора доведена до  $10^{-12}$  М нейротоксина. Один из подходов к осуществлению переноса электронов между активным центром фермента и электродом заключается в использовании для иммобилизации ферментов матриц проводникового и полупроводникового характера.

Большой класс потенциальных носителей при создании биокатализаторов составляют органические полимерные полупроводники. Электропроводность полупроводниковых полимеров может изменяться в широком интервале ( $10^{-15}$ – $10^4$  Ом $^{-1}$ ·см $^{-1}$ ) и приближаться к электропроводности металлов. Для иммобилизации ферментов интерес представляют по крайней мере два класса органических полупроводников.

**1. Полимеры с системой сопряженных связей, обладающие длинной цепью сопряжения.** Они имеют сравнительно высокую электропроводность и представляют собой электронно-неоднородные системы, в которых области полисопряжений, характеризующиеся «металлической» проводимостью, разделены диэлектрическими участками. Перенос электронов через диэлектрические участки определяет общий барьер транспорта электронов.

Термически обработанный полиакрилонитрил является достаточно хорошо изученным полимерным полупроводником. Электропроводность образцов зависит от температуры термической обработки. Носители были химически модифицированы окислением концентрированной азотной кислотой (введение нитро- и гидроксигрупп), обработкой гидразином и восстановлением с образованием аминогрупп. Иммобилизацию ферментов проводили на окисленных образцах термически обработанного полиакрилонитрила после гидрогенолиза и восстановления с использованием бифункционального реагента — глутарового альдегида. Интересно отметить, что между степенью окисления термически обработанного полиакрилонитрила и активностью иммобилизованного фермента существует оп-

ределенная корреляция: емкость носителя до 100 мг белка на 1 г полимера. В последние годы широкое распространение получили органические полупроводники при электрохимической полимеризации ароматических соединений непосредственно на электроде (полипирол, полианилин, полимер метиленовый синий).

**2. Полимеры с комплексами переноса заряда (КПЗ).** Предельным вариантом сильных КПЗ являются ион-радикальные пары. В системах с КПЗ, так же как и в системах с полисопряжением, электропроводность обеспечивается за счет  $\pi$ -электронов, но делокализация их происходит в плоскостях, перпендикулярных плоскостям, упакованных в пачки молекул. Механизм проводимости обусловлен ион-радикальным диспропорционированием в пачках, состоящих из доноров и акцепторов электронов. Классическим примером проводников, действующих по ион-радикальному механизму, являются соли на основе тетрацианхинодиметана (TCNQ). Проводимость в таких системах обычно связывают с образованием КПЗ между молекулами TCNQ.

Способ получения таких иммобилизованных ферментов заключается в соосаждении поликатионов с ферментами под действием полувосстановленной соли TCNQ. Фермент иммобилизуется в водонепроницаемые полимеры с высокой электропроводностью (вплоть до  $10^{-2}$  Ом $^{-1}$ ·см $^{-1}$ ). Емкость носителей — до 500 мг белка на 1 г носителя.

Использование новых материалов органических полупроводников с включенными в них ферментами позволило создать новое поколение биосенсоров. В некоторых случаях электрохимические биосенсоры удобно реализовывать в форме потенциометрических ячеек с измерением смещения потенциала электрода, возникающего за счет электрохимической реакции. Калибровочная кривая в этом случае коррелирует смещение потенциала и логарифмическое значение концентрации аналита.

## КЛЕТочНЫЕ БИОСЕНСОРЫ

Одно из достижений биотехнологии и биоинженерии связано с развитием методов включения живых клеток в полимеры и твердые носители различной природы и применением такого рода материалов для решения задач медицины, управляемого биосинтеза, анализа. С использованием живых иммобилизованных клеток создано много различных биосенсоров [4]. Можно отметить несколько удивительных свойств иммобилизованных клеток.

1. Клетки — доступный биологический материал. Используют клетки растений, животных, человека, но наибольшее применение нашли клетки микроорганизмов, которые культивируются, легко воспроизводятся и поддерживаются в чистой культуре. В отличие от ферментов при использовании клеток не требуется дорогостоящих стадий очистки.

2. Имеющиеся методы иммобилизации позволяют получить клетки, сохраняющие около 100% активности ферментов и способные функционировать достаточно длительные промежутки времени. Клетки сохраняют все наиболее важные структуры и проявляют большую стабильность. В некоторых случаях клетки сохраняют жизнеспособность и активность ферментных систем в течение нескольких лет.

3. Клетки сохраняют, как правило, все системы жизнеобеспечения, включая ферментные стадии регенерации кофакторов. Это позволяет проводить сложные последовательные реакции, осуществляя многостадийные процессы.

4. Для многих типов клеток, особенно микробных, разработаны эффективные методы генетических операций, дающие возможность получать мутанты с высоким содержанием того или иного белка или фермента, что дает возможность оперировать с высокоэффективными каталитическими системами. Поскольку клетки сохраняют аппарат биосинтеза белка, потенциально могут быть разработаны высокоэффективные методы генодиагностики.

Особенности метаболизма клеток позволяют создавать биосенсоры как на индивидуальные молекулы, так и на очень широкие классы соединений, например на всю совокупность биологически поглощаемых веществ. Для создания клеточных биосенсоров, так же как и для ферментных, используются самые различные физические трансдюсеры: электрохимические, включая амперометрические (детекторы кислорода, пероксида водорода, медиаторы), потенциометрические (рН-чувствительные и ионселективные электроды, рН-чувствительные полевые транзисторы), кондуктометрические, оптические, акустические, калориметрические. Развитие получили биосенсоры с использованием техники LAPS (светоадресуемых потенциометрических сенсоров). LAPS-система достаточно чувствительна, и на ее основе были созданы системы слежения за физиологическим состоянием отдельных клеток — так называемые микрофизиометры.

Принципиальным вопросом при создании клеточных биосенсоров является метод иммобилизации клеток. Первоначально для иммобилизации клеток с сохранением их активности использовали материалы природного происхождения: желатину, агар, альгинат кальция, каррагенан. В последние годы разработаны и развиты методы включения живых клеток в синтетические полимерные гели. Особенно интересные и перспективные результаты получены с использованием так называемого метода криоиммобилизации клеток [5]. Процедура иммобилизации состоит из стадии получения суспензии клеток в растворе полимера, замораживания суспензии с получением криоструктурированных гелей, размораживания с образованием пористого, механически прочного материала, устойчивого до температур 70–80°C. Клетки, включенные в такого

рода пористый материал, сохраняют активность и способны функционировать в течение нескольких месяцев.

Применения клеточных биосенсоров достаточно многообразны. Созданы биосенсоры для селективного определения фенолов, пролина, глутамина, тирозина, молочной и аскорбиновой кислот, глюкозы. Интересные возможности связаны с анализом сульфат-иона, аммония, монометилсульфата. Уникальные возможности обеспечивают клеточные биосенсоры для экспресс-анализа качества воды и сточных вод. Существует метод определения БПК (биологического потребления кислорода) — анализ на определение совокупности органических соединений, которые могут быть использованы микроорганизмами. Традиционный метод требует для получения данных несколько дней. Биосенсор с иммобилизованными клетками позволяет получать эти же результаты в течение нескольких минут. Коммерчески значимые прототипы биосенсоров для определения качества воды созданы компаниями Японии, Германии и Бельгии.

Биосенсоры как новые аналитические устройства, позволяющие получать и перерабатывать экспресс-информацию о химическом составе тех или иных объектов, находятся в начале своего развития. Можно ожидать существенного вклада этих биоэлектронных устройств в повышение качества медицинских анализов, контроля технологических процессов, оценки качества пищевых продуктов и окружающей среды.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Clark L.C., Lyons C. // Ann N.Y. Acad. Sci. 1962. Vol. 102. P. 29–45.
2. Березин И.В., Богдановская В.А., Варфоломеев С.Д. и др. // Докл. АН СССР. 1978. Т. 240. С. 615–619.
3. Варфоломеев С.Д., Березин И.В. В кн.: Физическая химия: Современные проблемы / Под ред. Я.М. Колотыркина. М.: Химия, 1982. С. 68–94.
4. Корпан Я.И., Ельская А.В. // Биохимия. 1995. Т. 60. С. 1988–1998.
5. Lozinsky V.I. et al. // Biotechnol. Lett. 1984. Vol. 2. P. 43–48.

\* \* \*

Сергей Дмитриевич Варфоломеев, доктор химических наук, профессор, зав. кафедрой химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. Область научных интересов: физико-химическая биология и биотехнология. Автор более 300 статей и девяти монографий.