

Л. О. Ягодина, Ю. В. Чернохвостов

ИММОБИЛИЗАЦИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ИНКАПСУЛЯЦИЕЙ В ПОЛИМЕРНЫХ НАНО- И МИКРОКАПСУЛАХ

Ключевые слова: капсулирование в ПНМК, ацетилхолинэстераза.

Получены полимерные капсулы с порами наноразмера, включающие активный фермент ацетилхолинэстеразу (AChE) способную функционировать длительное время. Рассмотрена возможность использования капсул с AChE в потенциометрических микроэлектродах для экспресс-анализа на содержание вредных примесей в промышленных отходах

Keywords: microcellular polyelectrolytic coating, acetylholynesterase.

The microcellular polyelectrolytic coating containing acetylholinesterase has been investigated. The activity of coating AChE is consistent about 40% of nonimmobilized enzyme.

Введение

Ацетилхолинэстераза (AChE) – фермент класса гидролаз, отвечающий за гидролиз нейромедиатора ацетилхолина. Реакция гидролиза ацетилхолина до холина и остатка уксусной кислоты, катализируемая ацетилхолинэстеразой, необходима для инактивации нейромедиатора в синаптической щели и перехода клетки-мишени в состояние покоя (например, при расслаблении мышечной клетки). Современные синтетические ингибиторы ацетилхолинэстеразы – это чаще всего фосфо-органические соединения, которые, как правило, являются ядами для человека и присутствие их в окружающей среде крайне нежелательно. Необходимость обнаружения в среде ингибиторов ацетилхолинэстеразы привела к созданию датчиков, улавливающих различные концентрации ядов. Так, например, описаны различные биосенсоры для обнаружения пестицидов, в частности и на основе иммобилизованной ацетилхолинэстеразы [1-3]. Значительный интерес, как нам кажется, представляет задача создания портативного прибора на основе pH-метра, позволяющего определять ингибирование AChE вредными примесями в промышленных отходах [4]. Мы предполагаем, что создание ацетилхолинэстеразного наносенсора по методике, разработанной М.М. Монтрелем [5] и впервые примененной в его работе [6], позволит впервые зарегистрировать изменения в активности AChE с большой степенью точности.

В работе [6] используется созданный по оригинальной методике мультислойный материал, который служит основой для создания биосенсоров и биокаталитических систем, поскольку ферменты при таком способе иммобилизации:

- свободно размещаются внутри микрокапсул и не связаны со стенками микрокапсул;
- защищены слоями полиэлектrolитов от неблагоприятных воздействий внешней среды (микробы, протеазы и другие инактивирующие факторы);
- имеют свободный доступ субстратов, проходящих через стенки ячеистых полиэлектrolитов [5].

Приведенные выше свойства, как мы надеемся, позволят успешно применить методику иммобилизации ацетилхолинэстеразы (AChE) капсулированием в полиэлектrolитные нано- и микрокапсулы (ПНМК) для разработки ферментативного биосенсора с целью решения задач современной биотехнологии.

Материалы и методы

Использовали ацетилхолинэстеразу (AChE) из эритроцитов быка фирмы Sigma. В качестве заряженных полиэлектrolитов использовали полистиролсульфонат натрия (ПСС) с молекулярной массой 70 000 и полиалиламин гидрохлорид (ПАА) с молекулярной массой 56 000 фирмы Sigma (США). Составные микросферолиты CaCO₃-белок (коровые частицы) и полиэлектrolитные микрокапсулы, содержащие АХЭ, получали, как это описано ранее [5]. ПНМК изготавливали путем поочередного наслаивания противоположно заряженных полиэлектrolитов на дисперсные частицы нано- и микроразмеров, так называемых коров, с последующим разрушением этих частиц [7,8]. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [9]. Активность фермента, инкапсулированного в ПНМК, определяли методом Элмана [10]. Использовали субстрат – ацетилтиохолин фирмы Sigma. Все растворы готовили непосредственно перед опытом. Измерения скорости реакции, катализируемой AChE, проводили на спектрофотометре Perkin-Elmer (USA) в 1 см термостатируемой кювете при 36° С. pH растворов определяли на pH-метре ОР-204/1 с точностью 0,02 ед. в термостатируемой ячейке при 36° С.

Результаты и их обсуждение

В данной работе проводили инкапсуляцию AChE из эритроцитов быка, как это описано в методах, наслаивая 3, 5, 6, 9 или 10 слоев полиионов, начиная с ПАА или ПСС. Попытка начинать инкапсуляцию с ПАА не привела к созданию активного инкапсулированного фермента. Количество слоев, начинающихся с ПСС, влияло на активность инкапсулированного фермента незначительно, вероятно, в виду малой молекулы

субстрата. При этом, AChE инкапсулированная в ПНМК, проявляла ферментативную активность, сравнимую со свободным ферментом (рис. 1).

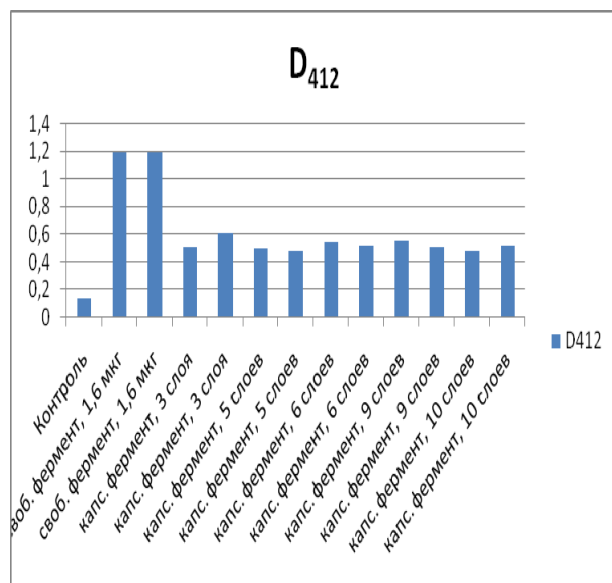


Рис. 1 - Оценка активности капсулированной ацетилхолинэстеразы по методу Элмана: концентрация AChE по Брэдфорду составляла 1,6 мкг/мл. Свободный фермент брали в той же концентрации; в контроле проверяли активность всех компонентов в буфере, исключая только ацетилхолинэстеразу

Как видно из рисунка, активность фермента в ПНМК составляет 45-50% от активности свободного фермента, что является хорошим результатом для иммобилизованных ферментов. Нами была проведена проверка стабильности капсулированной ацетилхолинэстеразы, как известно, неустойчивого фермента, быстро разрушающегося с потерей активности при комнатной температуре. Мы выдерживали капсулированный, как описано в методах, фермент, капсулы которого содержали 5 слоев в последовательности ПСС-ПАА-ПСС-ПАА-ПСС при комнатной температуре от 1 до 4-х суток. В качестве сравнения брали свободную AChE, находящуюся при тех же условиях в 0,1M К-фосфатном буфере. Свободная ацетилхолинэстераза теряла активность уже на вторые сутки, тогда как капсулированная AChE работала и через 4 дня. Фермент в капсулах сохранял ферментативную активность длительное время (около 2-х недель) при хранении при +4°C, что позволяет считать AChE достаточно перспективным ферментом для работы в микрослоях потенциометрического наносенсора на основе электрода pH-метра. Данный потенциометрический наносенсор ранее был применен при капсулировании уреазы [6] с последующей фиксацией капсул полиэлектролитными мультислоями. Причем наиболее высокую чувствительность биосенсора и линейность его ответа авторы [6] наблюдали при изменении концентрации субстрата от 0,2 до 20 mM.

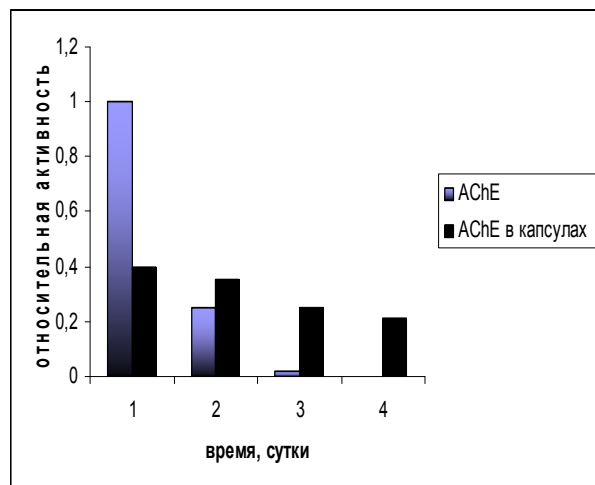


Рис. 2 - Активность свободной и инкапсулированной ацетилхолинэстеразы в зависимости от времени хранения при комнатной температуре. Активность дана в отношении к свободному ферменту сразу же после разведения в 0,01 M К-фосфатном буфере. Активность инкапсулированного в ПНМК фермента показана на рисунке черным цветом

С целью уточнения рабочих концентраций ингибиторов, действующих на капсулированную в ПНМК AChE, нами была проведена оценка условий ингибирования капсулированной в ПНМК ацетилхолинэстеразы. На рис. 3 прерывистой линией показана кривая скорости реакции, катализируемой AChE, инкапсулированной в трех микрослоях ПСС-ПАА-ПСС, в сравнении со свободной ацетилхолинэстеразой в зависимости от концентрации ингибитора в реакционной смеси.

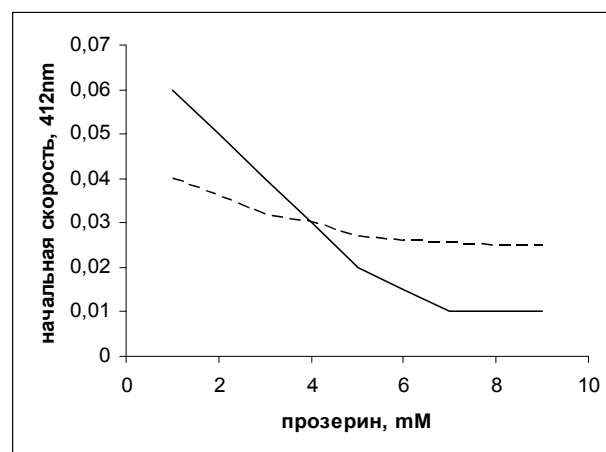


Рис. 3 - Начальная скорость реакции AChE в капсулах (прерывистая линия на рисунке) и в свободном состоянии (непрерывная линия): 5 mM ацетилтихолина, 2 mM DTNB, 0,1 M К-фосфатный буфер, pH 8,0; t = 36°C

Таким образом, нами показано, что ацетилхолинэстераза инкапсулированная в ПНМК не является в широком смысле «иммобилизованной», поскольку она проявляет кинетику свободного фермента в растворе, кроме того, фермент проявляет функциональную активность и стабильность

фермента значительно увеличивается – фермент не

теряет активность до двух недель при +4°C.

Литература

1. R.Sinha, M.Ganesana, S.Andreescu, L. Stanciu. *Anal Chim Acta*, **661**, 195-199 (2009).
2. Qu Y., Sun Q, Xiao F, Shi G, Jin L. *Bioelectrochemistry*, **77**, 139-144 (2010).
3. Х. Май Тхи Тхань, Э.П. Медянцева, Р.М. Варламова, Г.Р. Сахапова, О.В.Николаева. *Вестник Казанского технологического университета*, **15**, 15, 149-157 (2012).
4. С.М. Романова, В.И. Трескова, М.В. Шулаев. *Вестник Казанского технологического университета*, **14**, 22, 68 – 74 (2011).
5. М.М. Монтрель, В.И. Терновский, М.Г. Фомкина, А.И. Петров. Пат. РФ 2333231 (2008).
6. В.И. Терновский, Ю.В. Чернохвостов, М.Г. Фомкина, М.М. Монтрель. *Биофизика*, **52**, 825-829 (2007).
7. G. B. Sukhorukov, E. Donath, S. Davis, H. Lichtenfeld, F. Caruso, V. I. Popov, and H. Möhwald, *Polym. Adv. Technol.* **9**, 759-767 (1998).
8. М.Г. Фомкина, Л.О. Ягодина, А.М. Монтрель, Г.В. Минкабирова, И.С. Занавескина, Е.И. Маевский. Международный форум по нанотехнологиям Rusnanotech (Москва, 3-5 декабря 2008), Москва, с. 97, 2008.
9. G.L. Ellman, K.D.Courtney, V.J.Andres. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88-95 (1961).
10. М.М. Bradford. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).

© Л. О. Ягодина – канд. биол. наук, доц. каф. химической кибернетики КНИТУ, floral2010@mail.ru; Ю. В. Чернохвостов – инженер Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета.