

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 фосфоро-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 рН-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 полиэлектролитов от неблагоприятных воздействий внешней среды (микробы, протеазы и другие инактивирующие факторы); · имеют свободный доступ субстратов, проходящих через стенки ячеистых полиэлектролитов [5]. Приведенные выше свойства, как мы надеемся, позволят успешно применить методику иммобилизации ацетилхолинэстеразы (AChE) капсулированием в полиэлектролитные 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 полиэлектролитов 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 полиэлектролитные микрокапсулы, содержащие АХЭ, получали, как это описано ранее [5]. ПНМК изготавливали путем поочередного наслаивания противоположно заряженных полиэлектролитов 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 OP-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 0,1М 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°С, 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 М 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 ацетилтиохолина, 2 mM DTNB, 0,1 M К-фосфатный буфер, pH 8,0; $t = 36^{\circ}\text{C}$. 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 $+4^{\circ}\text{C}$.