

*На правах рукописи*

**Алпеева  
Инна Сергеевна**

**АНИОННЫЕ ПЕРОКСИДАЗЫ  
И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОАНАЛИЗЕ**

**02.00.15 – катализ  
03.00.23 – биотехнология**

**А в т о р е ф е р а т**  
**диссертации на соискание учёной степени**  
**кандидата химических наук**

**Москва – 2007**

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии Химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

**Научный руководитель:**

ведущий научный сотрудник, доктор химических наук, профессор  
Иван Юрьевич Сахаров

**Официальные оппоненты:**

профессор, доктор химических наук  
Анатолий Николаевич Решетиллов  
доктор биологических наук  
Ольга Владимировна Королева

**Ведущая организация:**

ФГУ Российский Кардиологический Научно-Производственный Комплекс  
Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию РФ

Защита состоится 29 мая 2007 года в 16 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.59 по химическим наукам при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992 Москва, Ленинские Горы, МГУ, Химический факультет, кафедра химической энзимологии, аудитория 202.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Химического факультета МГУ.

Автореферат разослан \_\_\_ апреля 2007 г.

Учёный секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук

\_\_\_\_\_ И.К. Сакодынская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Разработка новых ферментативных систем, позволяющих усовершенствовать старые и предложить новые варианты анализа для целей здравоохранения и охраны окружающей среды является одним из важнейших и перспективных направлений современной биотехнологии, поскольку именно ферментативные методы обеспечивают высокочувствительное и селективное определение физиологически активных веществ. В этой связи поиск, получение и характеристика новых ферментов для аналитической биотехнологии является актуальной задачей.

Одним из наиболее широко применяемых в аналитических целях ферментов является пероксидаза (КФ 1.1.11.7). Этот биокатализатор - один из ключевых ферментов, контролирующих рост растений, их дифференциацию и развитие. *In vitro* этот фермент широко применяется в иммуноферментном анализе и при конструировании ферментных электродов.

Хотя пероксидазы обнаруживаются в тканях практически всех растений, в настоящее время основным источником коммерчески доступной пероксидазы являются корни хрена (*Armoracia rusticana*). В то же время появление пероксидаз с повышенной стабильностью и отличной субстратной специфичностью могло бы повысить качество фермент-содержащих наборов и стимулировать разработку новых аналитических методов и промышленных процессов. С этой целью в настоящее время проводятся исследования пероксидаз из новых источников. На Химическом факультете МГУ им. М.В.Ломоносова под руководством д.х.н. Сахарова И.Ю. была впервые выделена пероксидаза из листьев пальм, которая обладала уникальной термостабильностью и кислотостабильностью, а также обладала повышенной стабильностью в органических растворителях. Учитывая многообразие флоры, можно предположить, что анионные пероксидазы растений из новых источников имеют хорошие перспективы для их практического использования в биотехнологии.

**Цели и задачи исследования.** Изучение молекулярных и каталитических свойств анионных пероксидаз растений (сои, пальмы и батата) и возможности их применения в аналитической практике в качестве активных компонентов биосенсоров и метки в иммуноферментном анализе с хемилюминесцентной детекцией.

В диссертационной работе были поставлены следующие задачи:

- Разработка метода выделения и очистки пероксидазы из кожуры клубней батата;
- Сравнительное изучение субстратной специфичности анионных пероксидаз (ПБ, ПП и ПС): по отношению к традиционно используемым

субстратам пероксидаз, металлоорганическим комплексам рутения, хемилюминесцентной реакции окисления люминола.

- Изучение свойств анионных пероксидаз в качестве компонентов биосенсоров: с прямым переносом электронов, с применением органических; с использованием медиаторов (комплекса осмия, модифицированных поливинилимидазолом); в биферментной системе с использованием алкогольоксидазы.
- Изучение свойств анионных пероксидаз в качестве метки в иммуноферментном анализе с хемилюминесцентной детекцией на примере ПС.

**Научная новизна работы.** Впервые получена и детально охарактеризована пероксидаза батата. Выделенная пероксидаза батата была использована для изучения ее субстратной специфичности в сравнении с другими пероксидазами растений. Впервые показаны преимущества использования анионной пероксидазы пальмы в качестве компонента биосенсоров для определения пероксида водорода с прямым и медиаторным переносом электронов, а также в составе биферментных электродов с алкогольоксидазой для определения этанола в образцах вин. Впервые продемонстрированы преимущества использования анионной пероксидазы сои в сравнении с катионной пероксидазой хрена в качестве метки в иммуноферментном анализе с хемилюминесцентной детекцией на примере «сэндвич» тест-системы для определения IgG мыши.

**Практическая значимость работы.** Как следует из представленных ниже результатов, анионная пероксидаза пальмы является наилучшей пероксидазой для создания пероксидаз-содержащих электрохимических биосенсоров. Использование коммерчески доступной анионной пероксидазы сои в сравнении с пероксидазой хрена в составе иммуноферментных наборов с хемилюминесцентной детекцией позволяет существенно улучшить их качество за счет увеличения значения линейного диапазона в области высоких концентраций аналитов и большей стабильности хемилюминесцентного сигнала во времени. Также показана перспективность практического использования циклометаллированных комплексов рутения в качестве медиаторов при проведении ферментативного окисления фенолов.

**Апробация работы.** Основные результаты исследования были представлены на Международных конференциях «Биокатализ-2000» (Москва, 2000), «Биокатализ-2002» (Москва, 2002), «Биотехнология – состояние и перспективы развития, 2002» (Москва, 2002), «Биотехнология – состояние и перспективы развития, 2003» (Москва, 2003), «Joint Meeting Bioelectrochemistry-2005» (Коимбра, Португалия, 2005) и международном конгрессе по аналитической химии «ISAC-2006» (Москва, 2006).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликованы: 8 статей и 7 тезисов докладов международных конференций.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения; обзора литературы (три главы); описания материалов и методов исследования; результатов и их обсуждения (четыре главы); выводов и списка цитируемой литературы, включающего 152 ссылки. Работа изложена на 130 страницах и включает в себя 45 рисунков и 25 таблиц.

## **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ**

### **I. Выделение и очистка пероксидазы из кожуры клубней батата**

При скрининге тропических растений было найдено, что клубни батата содержат высокий уровень пероксидазной активности. Поскольку пероксидазная активность в кожуре была приблизительно в 30 раз выше, чем в мякоти, было высказано предположение, что основной пероксидазный пул локализован в кожуре. Подобная локализация может быть связана с участием ПБ в процессе суберилизации при формировании полифенольной матрицы.

Первоначально были оптимизированы условия получения экстракта из кожуры батата. Наиболее эффективно экстракция происходила при щелочных условиях (10 мМ боратный буфер, рН 9.0). Использование буферов с более низкими значениями рН (цитратный буфер, рН 3.0, ацетатный буфер, рН 5.0 и фосфатный буфер, рН 7.0) снижало выход экстракции и приводило к получению экстрактов с активностью ниже в 2.2-, 1.3- и 1.2- раза, соответственно.

Поскольку, как хорошо известно, пероксидазы в растительных источниках представлены как в растворимой, так и связанной с мембраной формах, в рамках представленной работы так же были изучены эффекты влияния ионной силы и детергента на выход экстракции ПБ. Оптимальное значение концентрации NaCl для экстракции при использовании боратного буфера с рН 9.0 составило 0.5 М. Повышение концентрации Тритона X-100 до 0.1% не оказывало влияния на пероксидазную активность получаемого субстрата.

Изучение кинетики экстракции показали, что для достижения максимума экстракции необходимо 3-х-часовая инкубации. Более длительная экстракция приводила к снижению ферментативной активности, связанное, по-видимому, с инактивацией пероксидазы фенолами и продуктами их окисления, параллельно экстрактируемыми из кожуры батата. Подобранные оптимальные условия экстракции ПБ позволили определить уровень пероксидазной активности в кожуре батата, равный 770 единиц на г веса кожуры.

Результаты очистки ПБ представлены в Таблице 4.1. Как и многие другие экстракты из растительных источников, экстракт из батата содержал высокую концентрацию пигментов. Эти соединения (полифенолы) химически активны и могут необратимо модифицировать хроматографические носители, используемые для выделения ферментов. Для предотвращения такой модификации был разработан простой и быстрый метод удаления пигментов. Он основывается на разделении пероксидазы и пигментов в водной двухфазной системе, состоящей из полиэтиленгликоля и сульфата аммония. Максимальное удаление пигментов и наиболее высокий процент сохранения пероксидазной активности наблюдается в системе, содержащей 8.5%  $K_2HPO_4$  и 14% ПЭГ (мм 10 000).

**Табл. 1.** Очистка пероксидазы из кожуры батата

	Объем (мл)	Концентрация белка	Белок (мг)	Удельная активность белка (U/мг)	Суммарная активность (U)	Выход (%)	Степень очистки
Экстракция пигментов	1 290	4.9	6 300	42	265 000	100	1
Гидрофобная хроматография	190	1.4	270	700	189 000	70	17
Ионообменная хроматография	36	0.23	8.3	4 900	40 600	15	117

Дальнейшая очистка ПБ проходила с использованием гидрофобной хроматографии на колонке с Фенил-Сефарозой (рис. 2.). Сульфат аммония добавлялся до концентрации 1.7 М к раствору, содержащему пероксидазу, который затем был нанесен на колонку, уравновешенную 0.1 М фосфатным буфером, pH 6.5 с 1.7 М  $(NH_4)_2SO_4$ . При таких условиях пероксидаза полностью адсорбировалась на Фенил-Сефарозе. ПБ элюировалась в градиенте концентрации  $(NH_4)_2SO_4$  от 1.7 до 0 М в фосфатном буфере, pH 6.5. Стадия хроматографической очистки повысила удельную активность в 17 раз.

Конечной стадией очистки являлась ионообменная хроматография на колонке с DEAE-Тоуорепарл (рис. 3.), в результате которой удельная активность препарата, измеренная по отношению к гваяколу, составила 4 900 U/мг белка.

Очищенный препарат ПБ мигрировал в Ds-Na-электрофорезе как белок с молекулярной массой 37 кДа. Это значение было ниже, чем для мол. масса ПХ и близко к значениям ПС и пероксидазы табака.

Проведение изоэлектрофокусирования показало, что ПБ является анионным ферментом, значение pI которого составило 3,5. Ранее другие анионные пероксидазы были выделены из табака, пальмы, сои и других растений.

Спектр поглощения ПБ с максимумом при 401 нм (полоса Core), 497 и 638 нм характерен для всех пероксидаз растений. Значение RZ (отношение

поглощения при полосе Сорс и 280 нм) составило 3.4, что также подтверждает высокую степень очистки полученного препарата ПБ.

## II. Субстратная специфичность анионных пероксидаз

### II.1. Субстратная специфичность анионных пероксидаз в отношении традиционно используемых субстратов

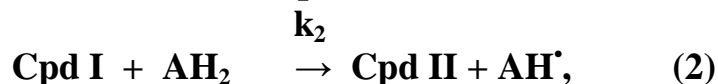
Так как способность окислять различные ароматические субстраты сильно варьирует в ряду растительных пероксидаз, в данной работе была исследована субстратная специфичность выбранных для изучения анионных пероксидаз (ПБ, ПП и ПС). Первоначально изучение проводилось в отношении традиционно используемых субстратов (доноров протонов) пероксидаз, а именно АБТС, о-фенилендиамина, о-дианизидина, феруловой кислоты, пирокатехина и гваякола. Поскольку субстратная специфичность ПП и ПС в отношении таких субстратов была уже описана, часть из которых была проведена в нашей лаборатории, для этих пероксидаз использовались литературные данные по субстратной специфичности к представленному ряду субстратов.

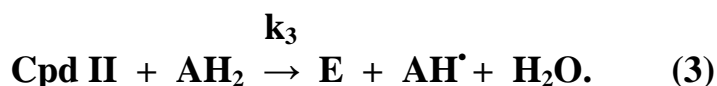
Хорошо известно, что оптимальные условия катализа для пероксидаз из различных источников могут сильно различаться. Поэтому для реакций ферментативного окисления исследуемых субстратов в присутствии ПБ были определены рН-оптимум, оптимальные концентрации пероксида водорода, субстрата-восстановителя и буфера (табл. 2.).

**Табл. 2.** Экспериментальные условия определения субстратной специфичности пероксидазы батата

Субстраты (АН)	$\lambda$ , нм	$\epsilon$ , $M^{-1} cm^{-1}$	$[H_2O_2]$ , мМ	$[АН]$ , мМ	рН	$[буфер]$ , мМ
АБТС	414	31 100	0,075	0,008	4,3	50
Феруловая к-та	318	6 000	0,5	0,3	4,5	50
о-дианизидин	420	30 000	4,2	11,4	4,5	50
о-фенилендиамин	445	11 100	4,2	5,5	5,0	50
гваякол	470	5 000	2,5	5,5	5,5	50
			2,5	5,5	3,5	50
пирокатехин	295	1 700	1,0	25,0	5,5	20

При найденных выше (табл. 2.) наиболее благоприятных условиях была оценена эффективность катализа окисления изучаемых субстратов пероксидом водорода в присутствии ПБ. Как известно, катализ пероксидазы реализуется по механизму «пинг-понг» (1-3) с образованием двух промежуточных соединений - Срд I и Срд II.





Наиболее медленной реакцией, лимитирующей весь каталитический процесс, как показано было в случае пероксидазы хрена, является реакция между Cpd II и субстратом (AH<sub>2</sub>) (ур. 3). Поэтому для оценки эффективности катализа пероксидазы должна быть рассчитана величина константы реакции второго порядка (k<sub>3</sub>):

$$k_3 = \frac{V}{[\text{Cpd II}] [\text{AH}_2]}, \quad (4)$$

где V – регистрируемая скорость окисления субстрата. Так как при оптимальной концентрации пероксида водорода концентрация Cpd II, как было показано ранее, практически совпадает с исходной концентрацией пероксидазы, то величина k<sub>3</sub> приблизительно равна величине k<sub>эфф</sub>:

$$k_3 \approx k_{\text{эфф}} = \frac{V}{[\text{E}]_0 [\text{AH}_2]}. \quad (5)$$

Аналогичный подход для оценки эффективности различных пероксидаз успешно применялся ранее.

Величины k<sub>эфф</sub>, характеризующие эффективность ферментативного окисления изучаемых субстратов в присутствии ПБ, приведены в табл. 3. Как хорошо видно, наиболее «медленными» субстратами являются пирокатехин и гваякол, производные фенола. Такие соединения, как *o*-дианизидин и *o*-фенилендиамин (ароматические амины), окисляются пероксидом водорода в присутствии ПБ значительно быстрее. Однако наилучшими субстратами для ПБ оказались АБТС и феруловая кислота. Если в случае АБТС (синтетического субстрата) высокое значение k<sub>эфф</sub> имеет исключительно прикладное значение, то в случае феруловой кислоты высокое значение константы k<sub>эфф</sub> позволяет предположить, что анионная ПБ в условиях *in vivo* активно участвует в процессах лигнификации.

Сравнение значений k<sub>эфф</sub>, полученных для пероксидаз ПБ и ПП, показало, что ПП по отношению к большинству субстратов является более эффективным биокатализатором. Сопоставление же субстратной специфичности анионных ПБ, ПП, ПС и пероксидаз из других растений (табл. 3.) показало их каталитическую уникальность, что в сочетании с отмеченной ранее высокой стабильностью, как в случае ПП, так и ПС, создает отличные перспективы для их практического использования.



**Табл. 3.** Субстратная специфичность некоторых растительных пероксидаз

Субстраты	$k_{эфф} \times 10^6 (M^{-1}c^{-1})$						
	Источник пероксидазы						
	батат	пальма	соя	хрен	табак	арахис	люцерна
<b>АБТС</b>	<b>3.5</b>	<b>52.0</b>	<b>0.36</b>	<b>4.0</b>	<b>1.1</b>	<b>0.37</b>	<b>1.0</b>
<b>феруловая к-та</b>	<b>27.0</b>	<b>63.0</b>	-	-	-	-	-
<b>о-дианизидин</b>	<b>0.7</b>	<b>1.0</b>	<b>0.39</b>	<b>4.3</b>	<b>2.0</b>	<b>2.0</b>	<b>2.4</b>
<b>о-фенилендиамин</b>	<b>1.2</b>	<b>2.9</b>	<b>0.04</b>	<b>0.49</b>	<b>0.03</b>	<b>0.22</b>	<b>0.04</b>
<b>гваякол</b>	<b>0.5</b>	<b>1.2</b>	<b>0.64</b>	<b>1.6</b>	<b>0.51</b>	<b>2.4</b>	<b>15.0</b>
<b>пирокатехин</b>	<b>0.1</b>	<b>0.23</b>	-	-	-	-	-

## **II.2. Изучение реакции окисления металлоорганических комплексов рутения в присутствии анионных пероксидаз и их медиаторных свойств**

Как было показано в II.1., для пероксидаз существуют субстраты с низкими константами скорости окисления. Однако иногда технологическая необходимость требует ускорения протекания таких реакций. В связи с этим последнее время наблюдается повышенный интерес к изучению металлоорганических комплексов на основе рутения и осмия, некоторые из которых уже успешно применяются в качестве медиаторов при конструировании ферментативных биосенсоров. Принципиально новыми в ряду соединений такого рода являются рутениевые комплексы с ковалентной связью углерод – рутений. Ожидается, что такие комплексы будут хорошими субстратами пероксидаз и обладать высокой медиаторной активностью.

Были исследованы пять новых металлоорганических комплексов рутения (табл. 4.). При этом была использована методология, разработанная и примененная нами при изучении субстратной специфичности ПБ. Первоначально была предпринята попытка оптимизировать условия ферментативного окисления рутениевых комплексов пероксидом водорода в присутствии анионных ПП и ПБ и катионной ПХ.

Сравнение оптимальных условий окисления рутениевых комплексов пероксидом водорода в присутствии ПП, ПБ и ПХ (табл. 4.) показывает значительные отличия в оптимальных значениях концентрации окислителя. Так, в случае анионных ПП и ПБ максимальная ферментативная активность наблюдалась при концентрации пероксида водорода, равной 0,12 и 0,8 мМ, соответственно, то в случае катионной ПХ это значение было заметно выше и составило 3.3 мМ.

При определенных оптимальных условиях (табл. 4.) были оценены значения эффективной константы второго порядка  $k_{эфф}$ , характеризующие эффективность рутениевых комплексов как субстратов ПП, ПБ и ПХ. Результаты приведены в табл. 5.

Полученные данные демонстрируют, что все пять представленных рутениевых комплексов окисляются в присутствии каждой из пероксидаз (ПП, ПБ и ПХ) с примерно одинаковыми скоростями. Однако, если сравнивать данные по трем пероксидазам, то можно отметить, что если для ПП и ПХ значения  $k_{эфф}$  были равны  $1.0-2.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , то в случае ПБ аналогичные значения были на порядок ниже для всех изученных комплексов.

**Табл. 4.** Оптимальные условия ферментативного окисления рутениевых комплексов в присутствии анионных пероксидаз

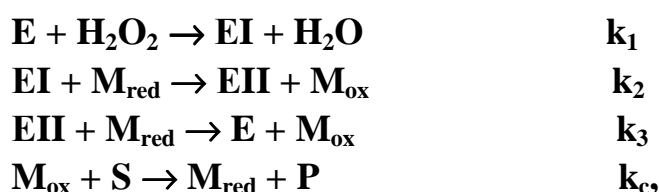
Рутениевые комплексы	ПХ				ПБ				ПП			
	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], мМ	[S], мМ	рН	[Буфер], мМ	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], мМ	[S], мМ	рН	[Буфер], мМ	[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], мМ	[S], мМ	рН	[Буфер], мМ
[Ru(phpy)(bpy) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	3.3	0.1	4.5	10	0.82	0.1	4.5	10	0.12	0.1	4.5	10
[Ru(phpy)(phen) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	3.3	0.1	4.5	10	0.82	0.1	4.5	10	0.12	0.1	4.5	10
[Ru(phpy)(Me <sub>2</sub> bpy) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	3.3	0.1	4.5	10	0.82	0.1	4.5	10	0.12	0.1	4.5	10
[Ru(topy)(bpy) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	3.3	0.1	4.5	10	0.82	0.1	4.5	10	0.12	0.1	4.5	10
[Ru(topy)(phen) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	3.3	0.1	4.5	10	0.82	0.1	4.5	10	0.12	0.1	4.5	10

**Табл. 5.** Эффективная константа скорости окисления рутениевых комплексов для трех пероксидаз растений

Комплекс	$k_{эфф}, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$		
	ПХ	ПБ	ПП
[Ru(phpy)(bpy) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	$2.4 \times 10^7$	$3.1 \times 10^6$	$1.0 \times 10^7$
[Ru(phpy)(phen) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	$2.7 \times 10^7$	$7.0 \times 10^6$	$1.6 \times 10^7$
[Ru(phpy)(Me <sub>2</sub> bpy) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	$2.0 \times 10^7$	$5.3 \times 10^6$	$1.3 \times 10^7$
[Ru(topy)(bpy) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	$1.4 \times 10^7$	$6.0 \times 10^6$	$2.0 \times 10^7$
[Ru(topy)(phen) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub>	$1.0 \times 10^7$	$1.9 \times 10^6$	$1.4 \times 10^7$

Сравнение полученных значений констант скоростей окисления рутениевых комплексов с данными по окислению традиционно используемых субстратов для ПП, ПБ и ПХ (табл. 3.) позволяет сделать вывод о том, что рутениевые комплексы являются «хорошими» субстратами исследуемых пероксидаз.

Высокие значения констант  $k_{эфф}$  позволили предположить, что рутениевые комплексы могут быть использованы как медиаторы в реакции окисления некоторых ароматических субстратов в присутствии пероксидазы. Как упоминалось выше, реакции окисления некоторых ароматических аминов и фенолов протекают с низкой скоростью, т. е. являются «плохими» субстратами пероксидаз. Процесс можно ускорить, используя медиаторы – вещества, которые окисляются пероксидазой с большими скоростями и затем могут регенерировать, передавая полученный окислительный потенциал на «плохой» субстрат. Затем этот комплекс может снова участвовать в следующем ферментативном цикле. Учитывая выше сказанное, схема взаимодействия выглядит следующим образом:



где **E**, **EI** и **EII** – пероксидаза и ее окисленные формы,  
**M<sub>red</sub>**, **M<sub>ox</sub>** – восстановленная и окисленная форма медиатора,  
**S** – «плохой» субстрат пероксидазы,  
**P** – продукты реакции.

Так как значения констант скорости окисления для всех комплексов подобны (табл. 5.), для дальнейшего анализа был выбран [Ru(phpy)(bpy)<sub>2</sub>]PF<sub>6</sub>. В качестве субстрата с низким значением k<sub>эфф</sub> был выбран пирокатехин (табл. 3.), часто используемый как модельный субстрат пероксидаз.

Поскольку добавление рутениевых комплексов сильно увеличивает поглощение при длине волны 295 нм (максимум поглощения продуктов окисления пирокатехина), за изменением концентрации пирокатехина в процессе реакции наблюдали методом ВЭЖХ.

**Табл. 6.** Кинетические параметры реакции ферментативного окисления пирокатехина перекисью водорода

РЕАКЦИЯ	k, М <sup>-1</sup> с <sup>-1</sup>
пирокатехин + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> →	1.1 x 10 <sup>-7</sup>
пирокатехин + [Ru <sup>2+</sup> (phpy)(bpy) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> →	9.0 x 10 <sup>-3</sup>
E [Ru <sup>2+</sup> (phpy)(bpy) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> →	3.1 x 10 <sup>6</sup>
[Ru <sup>3+</sup> (phpy)(bpy) <sub>2</sub> ]PF <sub>6</sub> + пирокатехин →	0.75 ± 0.04

По площадям хроматографических пиков, полученным в различные моменты времени, были определены эффективные константы ферментативного окисления пирокатехина H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в присутствии и отсутствии рутениевого комплекса (табл. 6.), которые составили 5.0 x 10<sup>6</sup> М<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup> и 1.1 x 10<sup>2</sup> М<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup> соответственно.

Следует отметить, что величина k<sub>эфф</sub> пирокатехина, определенная в условиях данного эксперимента, несколько ниже k<sub>эфф</sub> пирокатехина, определенной в оптимальных условиях окисления пирокатехина. Это вызвано несколькими причинами: во-первых, введение детергента (ЦТАВ) в реакционную среду, добавленного для увеличения растворимости и стабильности при низких значениях pH рутениевых комплексов, снижает эффективность катализа пероксидазы; во-вторых, процесс исследовался при оптимальных условиях для окисления рутениевых комплексов, которые достаточно сильно отличаются от оптимальных условий окисления пирокатехина.

В любом случае, значение  $k_{эфф}$  реакции окисления пирокатехина в присутствии медиатора превышает значение  $k_{эфф}$  в его отсутствии, при оптимальных условиях окисления пирокатехина, более чем в 50 раз (табл. 6.).

### II.3. Изучение реакции окисления люминола в присутствии анионных пероксидаз

Поскольку в настоящее время пероксидазы широко используются в качестве метки в иммуноферментном анализе с хемилюминесцентной детекцией, где применяется реакция окисления люминола пероксидом водорода, в рамках работы по исследованию субстратной специфичности анионных пероксидаз была изучена реакция окисления люминола в присутствии ПП, ПБ и ПС. В качестве окислителя использовался пероксид водорода, а активность пероксидаз оценивалась по интенсивности образующегося сигнала хемилюминесценции.

Как и на предыдущих этапах работы, вначале были подобраны оптимальные условия катализа для изучаемых ферментов (табл. 7.).

**Табл. 7.** Оптимальные условия окисления люминола в присутствии пероксидаз растений

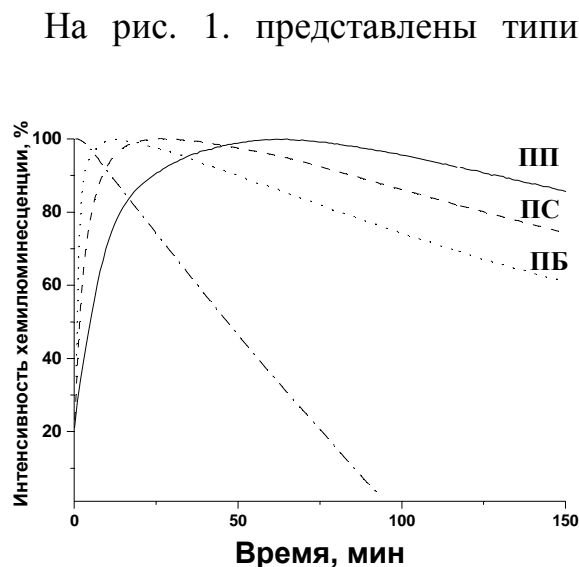
Условия	ПП	ПБ	ПС	ПХ
рН	8.2	7.8	8.3	8.6
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], мМ	4-8	4-6	6 - 10	2.0
[ЛЮМИНОЛ], мМ	6-10	8-10	4 - 10	1.5
[БУФЕР], мМ	30	100	100	100

Для эффективного окисления люминола в присутствии ПХ требуется введение в реакционную смесь, называемых “усилителями”. Классическим “усилителем” для ПХ является *p*-иодфенол. В случае анионных пероксидаз эффект *p*-иодфенола был крайне невелик.

В табл. 8. представлены основные данные зависимости интенсивности люминесценции от концентрации пероксидазы. Из полученных данных видно, что линейная зависимость интенсивности хемилюминесценции от концентрации пероксидазы наблюдается в диапазоне концентраций: 0.2 – 2.0 пМ для ПБ, 10 – 180 пМ для ПП и 10-100 пМ для ПС. Величина предела обнаружения пероксидазы была определена как концентрация фермента, в присутствие которого наблюдается интенсивность хемилюминесценции, втрое превышающей интенсивность фоновой реакции. В случае ПП, ПБ и ПС предел обнаружения составил 1.0 пМ, 0.01 пМ и 0.3 пМ соответственно. Следует отметить уникально низкое значение предела обнаружения для ПБ.

**Табл. 8.** Зависимость интенсивности хемилюминесценции от концентрации анионных пероксидаз

	<b>Линейный диапазон определяемых кон-ций, пМ</b>	<b>Предел обнаружения, пМ</b>
<b>ПП</b>	<b>10 – 180</b>	<b>1,0</b>
<b>ПБ</b>	<b>0,2 – 2,0</b>	<b>0,01</b>
<b>ПС</b>	<b>10 – 100</b>	<b>0,3</b>



**Рис. 1.** Типичные кинетические кривые изменения интенсивности свечения в процессе окисления люминола перекисью водорода в присутствии ПХ, ПП, ПС и ПБ.

люминола перексидом водорода в присутствие различных пероксидаз. Как хорошо видно, все приведенные кривые имеют различный характер. Так, в случае реакции усиленной хемилюминесценции, наблюдаемой в присутствии ПХ, на первом этапе интенсивность быстро достигает своего максимального значения, а затем также быстро уменьшается. Падение

интенсивности хемилюминесценции связано с инактивацией ПХ продуктами реакции окисления усилителей и люминола.

В отличие от ПХ, интенсивность свечения в реакции окисления люминола при использовании анионных пероксидаз (ПП, ПБ и ПС), хотя и нарастала несколько медленней, но, достигнув своего максимального значения, на протяжении длительного периода времени не изменялась. Данное явление, по-видимому, можно объяснить большей стабильностью анионных пероксидаз к воздействию радикальных продуктов реакции окисления люминола, что косвенно подтверждается данными по устойчивости ПП к радиационному облучению.

На основании полученных результатов можно говорить о перспективности использования анионных пероксидаз пальмы, батата и сои в иммуноферментном анализе в формате с хемилюминесцентной детекцией ферментативной активности. Так, все изученные в рамках данной работы анионные пероксидазы стабильны к продуктам реакции, что обеспечивает высокий стабильный сигнал на протяжении длительного времени. Особенно следует отметить, что для получения высокого хемилюминесцентного сигнала

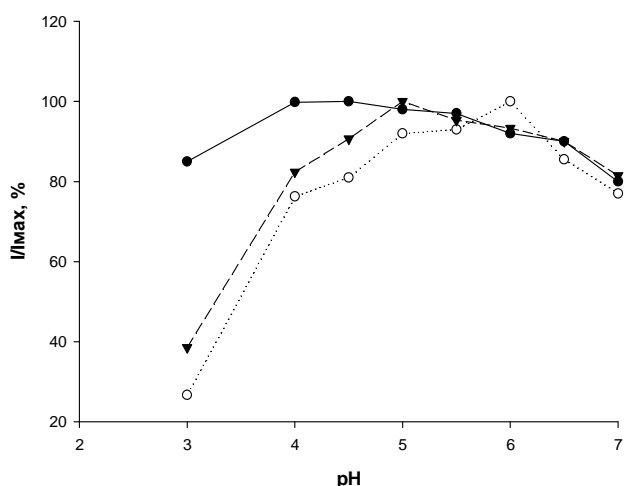
в случае изученных анионных пероксидаз не требуется использования усилителей. Кроме того, сравнение полученных данных показало, что хотя катализ окисления люминола анионными пероксидазами имеет много общего, все же каждая из анализируемых анионных пероксидаз привносит некую специфику в катализ реакции окисления люминола.

### II.3. Биосенсоры для определения пероксида водорода на основе анионных пероксидаз

#### II.3.1. Биосенсоры для определения пероксида водорода на основе анионных пероксидаз с прямым переносом электронов

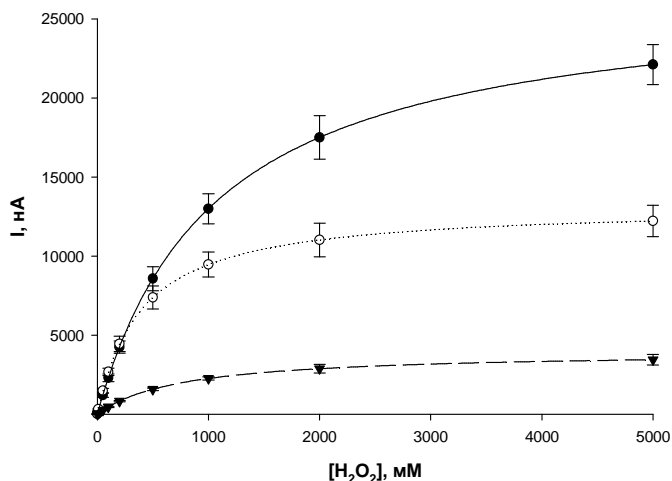
Хорошо известно, что пероксидазы являются рН-зависимыми ферментами. Более того, пероксидазы, выделенные из различных источников, проявляют максимальную активность при различных значениях рН. В этой связи биосенсоры, основанные на трех различных растительных пероксидазах (ПХ, ПП и ПБ), в первую очередь были протестированы при различных значениях рН (рис. 2.).

Для всех ферментов изучался прямой перенос электронов с поверхности электрода на фермент. Ранее было показано, что для ПХ, ПП и ПБ наблюдается  $49 \pm 4\%$ ,  $56 \pm 5\%$ ,  $91 \pm 6\%$  активных молекул, участвующих в прямом переносе электронов, соответственно. Сравнение полученных данных демонстрирует,



**Рис. 2.** Влияние рН на ответ биосенсоров на основе ПП (сплошная линия), ПХ (пунктирная линия), ПБ (штрих-пунктирная линия) для 0.1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 0.1 М фосфатном буфере при значении приложенного потенциала -50 мВ.

что биосенсоры на основе адсорбированных ПХ и ПБ имеют очень похожие профили рН-зависимости сигнала в диапазоне от 3 до 7 с максимальным значением при рН 5-6. Для биосенсоров на основе ПП, напротив, наблюдается расширенная область максимального значения сигнала на профиле рН-зависимости (рис. 2). Для таких биосенсоров высокие значения тока были получены в диапазоне рН от 2 до 6. Данное явление можно объяснить более высокой рН-стабильностью ПП по сравнению с ПХ и ПБ.



**Рис. 3.** Градуировочные графики, полученные с помощью биосенсоров на основе ПП (сплошная линия), ПХ (пунктирная линия), ПБ (штриховая линия). Экспериментальные условия: проточно-инжекционная система, приложенный потенциал  $-50$  мВ, скорость потока  $0.5$  мл/мин,  $0.1$  М фосфатный буфер, pH  $6.0$ .

Для всех изученных пероксидазных электродов наблюдался высокий ответ при pH  $6.0$ . При данном значении pH были получены градуировочные графики по пероксиду водорода для всех типов биосенсоров (рис. 3.). Полученные данные позволили рассчитать основные биоэлектрохимические параметры биосенсоров (чувствительность,  $S$ , линейный диапазон,  $LR$ ). Полученные данные представлены в табл. 9.

Сравнение полученных данных демонстрирует, что при сопоставимой чувствительности биосенсоры на основе анионной ПП обладают значительно более широким линейным диапазоном ( $1 - 700$  мМ), чем биосенсоры на основе

катионной ПХ ( $10 - 200$  мМ) и другой анионной пероксидазы ПБ ( $10 - 200$  мМ)

Сравнительное изучение инактивации ПХ, ПП и ПБ по отношению к пероксиду водорода позволило объяснить причину того, что для биосенсоров на основе ПП наблюдается более широкий линейный диапазон, чем в случае других биосенсоров.

Как видно из табл. 9, ПП не инактивируется в присутствии  $0.2$  мМ пероксида водорода в нейтральных условиях. Повышение концентрации пероксида водорода до  $20$  мМ позволяет обнаружить инактивацию ПП, однако константа скорости инактивации принимала очень низкое значение. В случае же двух других пероксидаз (ПХ, ПБ) специфическая активность напротив значительно понижалась при воздействии на них пероксида водорода.

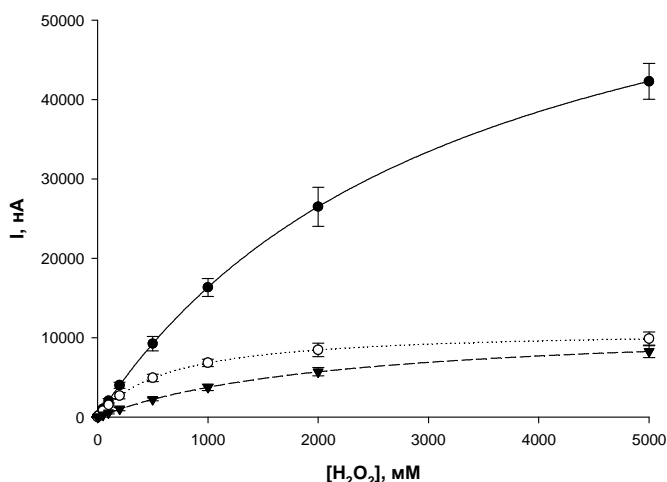
**Табл. 9.** Инактивация растительных пероксидаз в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ], мМ	$k_{inac} \times 10^3$ (мин <sup>-1</sup> )		
	ПП	ПБ	ПХ
<b>0 мМ</b>	0	0	0
<b>0.2 мМ</b>	0	$1.3 \pm 0.1$	$1.6 \pm 0.1$
<b>2 мМ</b>	$0.4 \pm 0.05$	$4.0 \pm 0.2$	$3.8 \pm 0.1$
<b>20 мМ</b>	$0.7 \pm 0.05$	$15.0 \pm 0.3$	$5.6 \pm 0.3$

Таким образом, более высокая стабильность ПП в присутствии пероксида водорода является ключевым моментом, позволяющим измерять концентрацию пероксида водорода вплоть до 700 мкМ при использовании биосенсоров на основе ПП (табл. 10.).

Более высокая кислотостабильность ПП даёт возможность использования биосенсоров на основе ПП в кислых условиях, которые часто используются в пищевых процессах (табл. 10.).

Для сравнения для биосенсоров на основе ПХ, ПП и ПБ были получены градуировочные графики по пероксиду водорода при кислых условиях (рН 4.5) (рис. 4). Из полученных результатов видно, что при понижении рН с 6 до 4.5 чувствительность биосенсоров на основе ПХ и ПБ заметно снижается, в то время как в случае биосенсоров на основе ПП градуировочные графики при обоих значениях рН были одинаковы и, следовательно, высокое значение чувствительности сохраняется и при кислом значении рН. Таким образом, биосенсоры на основе ПП демонстрируют уникальную возможность определения пероксида водорода в кислых и нейтральных условиях с одинаковой эффективностью.



**Рис. 4.** Градуировочные графики, полученные с помощью биосенсоров на основе ПП (сплошная линия), ПХ (пунктирная линия), ПБ (штриховая линия). Экспериментальные условия: проточно-инжекционная система, приложенный потенциал  $-50$  мВ, скорость потока  $0.5$  мл/мин,  $0.1$  М фосфатный буфер, рН  $4.5$ .

**Табл. 10.** Биоэлектрохимические параметры биосенсоров на основе ПП, ПХ и ПБ с прямым переносом электронов

	рН 6.0		рН 4.5	
	Чувствительность <sup>2</sup> , нА*мкМ <sup>-1</sup> *см <sup>-2</sup>	Линейный диапазон, мкМ	Чувствительность <sup>2</sup> , нА*мкМ <sup>-1</sup> *см <sup>-2</sup>	Линейный диапазон, мкМ
<b>ПП</b>	53	1 ÷ 700	56	1 ÷ 1000
<b>ПХ</b>	49	10 ÷ 200	30	10 ÷ 200
<b>ПБ</b>	10	10 ÷ 200	16	10 ÷ 200

Для практического применения ферментных электродов особое внимание следует уделять повышению операционной стабильности сенсора.



Стабильность биосенсора главным образом определяется стабильностью используемого фермента.

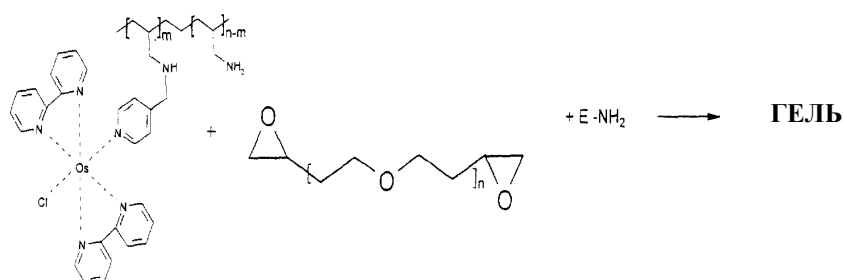
Сравнение операционной стабильности биосенсоров на основе ПХ, ПП и ПБ проводили путем пропускания через электролитическую ячейку раствора субстрата в течение длительного времени. При этих условиях сигнал биосенсора на основе ПП снижается лишь до 90%, в то время как для ПБ и ПХ ответ снижался до 30 и 45% от первоначального, соответственно.

Также была протестирована стабильность при хранении пероксидазных электродов, которые между измерениями хранились при + 4 °С. После семи дней хранения для биосенсоров на основе ПХ и ПБ наблюдалось лишь 27 и 22% от первоначального значения ответа (по току), тогда как для биосенсоров на основе ПП не наблюдалось какого-либо значительного снижения сигнала по отношению к 0.1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> за весь период.

### II.3.2. Биосенсоры для определения пероксида водорода на основе анионных пероксидаз с медиаторным переносом электронов

В настоящее время описан ряд биосенсоров с применением ПХ на основе медиаторного переноса электронов. В нашей работе иммобилизацию пероксидазы (ПХ, ПП, ПБ) на поверхности электрода проводили путем формирования слоя гидрогеля с включенными

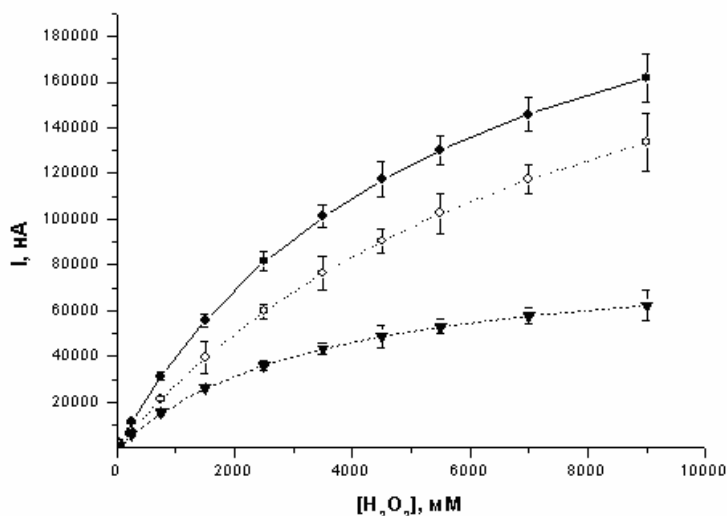
молекулами фермента, полученный в результате обработки редокс полимера (ПВИ<sub>10</sub>-Os) и пероксидазы бифункциональным сшивающим агентом (ПЭГДГЭ) (сх. 1). С использованием оптимизированных по составу биосенсоров были построены градуировочные графики по пероксиду водорода (рис. 5.) и рассчитаны основные параметры биосенсоров (табл. 11.).



**Схема 1.** Взаимодействие комплекса Os, модифицированного ПВИ, с концевыми NH<sub>2</sub>-группами пероксидазы и бифункционального сшивающего агента ПЭГДГЭ

редокс полимера (ПВИ<sub>10</sub>-Os) и пероксидазы бифункциональным сшивающим агентом (ПЭГДГЭ) (сх. 1). С использованием оптимизированных по составу биосенсоров были построены градуировочные графики по пероксиду водорода (рис. 5.) и рассчитаны основные параметры биосенсоров (табл. 11.).

Сравнение полученных данных показало, что биосенсоры на основе ПП и ПХ демонстрируют наибольший линейный диапазон определяемых



**Рис. 5.** Градуировочные графики по пероксиду водорода, полученные с помощью биосенсоров на основе медиаторного переноса электронов: ПП (сплошная линия), ПХ (пунктирная линия), ПБ (штрих-пунктирная линия). Экспериментальные условия: проточно-инжекционная система, приложенный потенциал  $-50$  мВ, скорость потока  $0.5$  мл/мин,  $0.1$  М фосфатный буфер, pH  $6.0$ .

концентраций пероксида водорода, который составил  $10 - 5\ 000$  мМ. В случае ПХ и ПБ линейный диапазон был уже и его значение составило  $10 - 4\ 000$  мМ и  $10 - 1\ 000$  мМ соответственно. Более значительные отличия наблюдались в чувствительности изученных биосенсоров. Так,

чувствительность биосенсоров на основе ПП практически в  $1.5$  раза превышала аналогичные параметры для ПХ и ПБ. Данные, полученные в случае медиаторного переноса электронов, хорошо

коррелируют с данными в случае прямого переноса электронов (П.3.1.), что свидетельствует о том, что при иммобилизации исследованные пероксидазы сохранили свои каталитические свойства. Особенно следует отметить, что использование медиатора привело к значительному увеличению значения линейного диапазона определяемых концентраций пероксида водорода в сторону увеличения концентрации для всех представленных пероксидаз.

**Табл. 11.** Биоэлектрохимические параметры биосенсоров на основе ПП, ПХ и ПБ с медиаторным переносом электронов

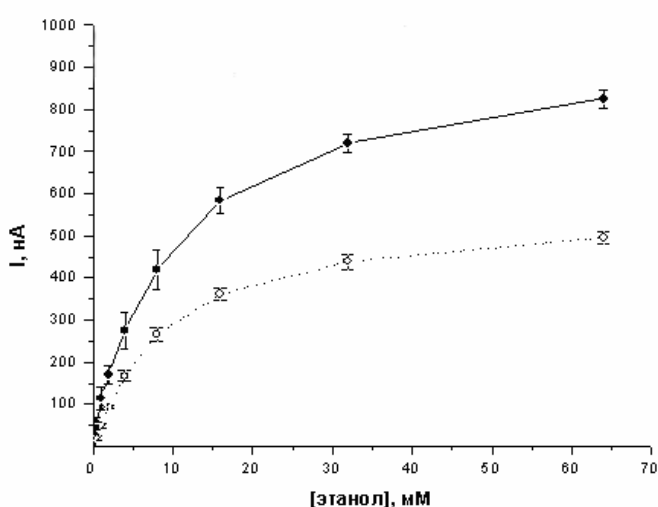
Тип биосенсора	Чувствительность, нА*мМ <sup>-1</sup> см <sup>-2</sup>	Линейный диапазон, мкМ
ПП/ПГЭДГЭ/ПВИ <sub>10</sub> Os (45.35%/11.33%/43.32% (по весу))	164	10 + 5000
ПХ/ ПГЭДГЭ/ПВИ <sub>10</sub> Os (22.67%/11.33%/65.99% (по весу))	117	10 + 4000
ПБ/ ПГЭДГЭ/ПВИ <sub>10</sub> Os (29.41%/22.59%/48.0% (по весу))	103	10 ÷ 1000

Кроме того, иммобилизация в редокс геле привела к ожидаемому увеличению операционной стабильности и стабильности при хранении биосенсоров для всех изученных пероксидаз. Как и в случае адсорбции на

поверхности электрода, наибольшая стабильность полученных биосенсоров наблюдалась для ПП.

### II.3.3. Биферменты биосенсоры на основе анионных пероксидаз и алкогольоксидазы

В последнее время разработано большое количество различных биосенсоров для определения этанола, главным образом, при использовании алкогольоксидазы (АО). Зачастую, однако, низкая стабильность полученных сенсоров является основным фактором, ограничивающим их практическое применение. Таким образом, в настоящее время остается актуальным вопрос о создании биосенсора для определения этанола с улучшенными



**Рис. 6.** Градуировочные графики, полученные с помощью биферментных биосенсоров на основе ПП (сплошная линия), ПХ (пунктирная линия). Экспериментальные условия: проточно-инжекционная система, приложенный потенциал  $-50$  мВ, скорость потока  $0.5$  мл/мин,  $0.1$  М фосфатный буфер, pH 6.0.

характеристиками (высокая чувствительность, быстрый ответ, стабильность).

Оптимальный перенос электронов между иммобилизированной в редокс-гидрогеле пероксидазой оказывается возможным только в том случае, когда этот слой не содержит АО, которая вероятно повышает среднее расстояние между редокс-полимером и пероксидазой. Поэтому был сконструирован двух-слойный биосенсор, где первый слой содержал пероксидазу (ПХ или ПП), иммобилизованную в

редокс гидрогеле, модифицированном комплексом Os, а второй слой был создан электрополимеризацией катодного полимера КП5 с одновременным включением в структуру АО.

После оптимизации состава биферментных биосенсоров были получены градуировочные графики по этанолу (рис. 6.) и рассчитаны основные биоэлектрохимические параметры (табл. 12.). Значения  $K_m$  схожи для двух типов биосенсоров и значительно превышали значение  $K_m$ , полученного для АО в растворе ( $2.7$  мМ). Это указывает на затрудненную диффузию этанола сквозь слой осажденного КП5. Подобное явление наблюдалось также для биосенсоров в отсутствии второго слоя при определении пероксида водорода.

Значение предела обнаружения (величина, превышающая в три раза соотношение сигнал/шум) было равным  $0,02$  мМ для обоих типов биосенсоров.

Разработанные биосенсоры демонстрировали достаточно высокую воспроизводимость сигнала по току ( $S_r$  5-10%,  $n = 3$ ).

**Табл. 12.** Биоэлектрохимические параметры биосенсоров на основе алкогольоксидазы и пероксидазы (ПП, ПХ)

Тип биосенсора	$I_{max}$ , нА	$K_m$ , мМ	Чувствительность, нА*мМ <sup>-1</sup> *см <sup>-2</sup>	Линейный диапазон, мМ	Предел обнаружения, мМ
ПХ/АО	$572 \pm 7$	$9.6 \pm 0.3$	60	1 ÷ 10	0.02
ПП/АО	$940 \pm 15$	$9.6 \pm 0.5$	98	1 ÷ 10	0.02

Для оценки операционной стабильности оптимизированных биферментных биосенсоров, они были интегрированы в автоматический инъекционный анализатор, позволяющий многократно впрыскивать образцы этанола с объемом 100 мкл и концентрацией 5 мМ.

Для определения операционной стабильности биосенсоров для анализа этанола в качестве образцов были использованы также образцы вина. Полученные константы инактивации демонстрируют, что стабильность биосенсоров в разбавленных образцах вина была несколько ниже, чем стабильность в водном растворе этанола.

**Табл. 13.** Константы инактивации биферментных биосенсоров в растворе

ПЕРОКСИДАЗА	$k_{inact}$ , мин <sup>-1</sup>	
	Раствор этанола в буфере	Образец вина, разбавленный буфером
ПС	0.00016	0.00027
ПХ	0.00017	0.00046

Полученные биосенсоры были использованы для определения этанола в образцах вин, содержание этанола в которых достигало 18%. Для анализа, проводимого методом добавок, использовались разведенные буфером в 1000 раз образцы вина. Данные по определению концентрации этанола в вине представлены в таблице 14. Результаты, полученные с помощью биосенсоров, демонстрируют хорошую корреляцию с другими методами.

**Табл. 14.** Определение этанола в образцах вин различными методами

Образец вина	[EtOH], М			
	<i>Метод добавочных стандартов при использовании биферментных биосенсоров на основе ПП</i>	<i>Метод добавочных стандартов при использовании биферментных биосенсоров на основе ПХ</i>	<i>Спектрофотометрический метод при использовании PQQ-АДГ</i>	<i>Концентрация, заявленная производителем (рефрактометрический метод)</i>
Каберне Совиньон (красное вино)	1.945	1.948	2.023	1.956
Херес (крепленое белое вино)	3.200	3.199	3.080	3.191
Шардоне (белое вино)	1.890	1.865	1.878	1.870

### **III. Применение анионных пероксидаз в иммуноферментном анализе на примере пероксидазы сои**

Как было показано выше (II.2.), анионные пероксидазы растений, катализируя окисления люминола пероксидом водорода, продуцируют стабильный длительный во времени хемилюминесцентный сигнал. Обнаруженный эффект послужил основанием для использования анионных пероксидаз в иммуноферментном анализе с хемилюминесцентной детекцией. Так как для синтеза иммуноконъюгатов с пероксидазой требуются препаративные количества фермента, в данной работе нами была использована пероксидаза сои, которая является коммерчески доступной. Как обычно, в качестве фермента сравнения была использована пероксидаза хрена (изофермент с).

В качестве модельной тест-системы был выбран «сэндвич» ИФА для определения IgG мыши. В «сэндвич» системе используются антитела, иммобилизованные на поверхности планшета, и антитела, меченные ферментом. Эта система является одной из наиболее распространенных для анализа поливалентных антигенов, таких как, например, иммуноглобулины класса G.

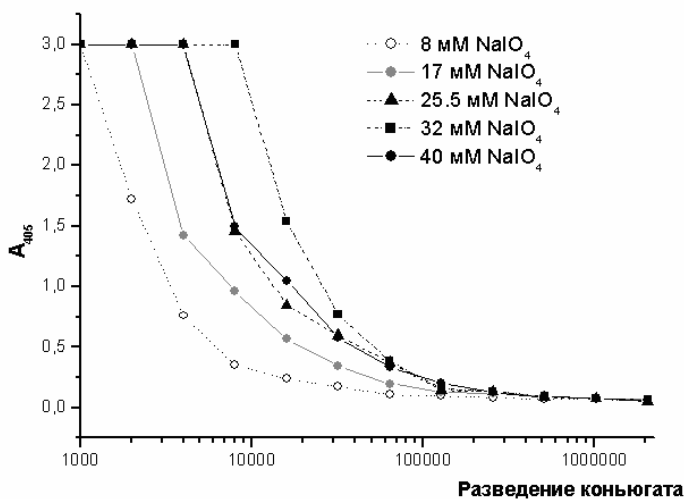
Выбор данной тест-системы объясняется доступностью иммунореагентов. Однако следует учесть также тот факт, что определение IgG имеет также практическое значение в связи с тем, что существует множество иммунологических наборов, включающих в качестве активного компонента моноклональные антитела мыши, и, соответственно, требующего их количественного определения.

Для синтеза конъюгатов пероксидазы с антителами использовали периодатный метод. В основе этого метода лежит окисление углеводов цепочек пероксидазы  $\text{NaIO}_4$  с образованием альдегидных групп, которые затем реагируют с аминок группами молекулы антитела или антигена. Данная реакция

широко используется на практике для получения конъюгатов ПХ с антителами или антигенами.

Хорошо известно, что степень гликозилирования ПХ и ПС различна, а также наблюдаются существенные различия в составе и локализации углеводной части. Поскольку совокупность данных параметров сильно влияет на свойства пероксидаз, в первую очередь были оптимизированы условия окисления ПС. Следует отметить, что ранее такие исследования не проводились.

При оптимизации условий окисления ПС варьировали концентрацию окислителя ( $\text{NaIO}_4$ ) в реакционной среде в интервале от 8 до 40 мМ. Полученные окисленные формы ПС реагировали с очищенными антителами, полученными при иммунизации кроликов IgG мыши. Эффективность синтезированных конъюгатов сравнивали, используя «сэндвич» ИФА с колориметрическим детектированием активности пероксидазы. На рис. 7.



**Рис. 7.** Кривые разведения конъюгатов пероксидазы сои с антителами кролика против IgG мыши, синтезированные при использовании раствора окислителя с различной концентрацией  $\text{NaIO}_4$ , получены методом ИФА со спектрофотометрическим детектированием.

видно, что наибольшую активность проявляет конъюгат, синтезированный при использовании раствора  $\text{NaIO}_4$  с концентрацией 32 мМ. Интересно отметить, что оптимальная концентрация  $\text{NaIO}_4$  в случае ПС значительно выше, чем используемая в случае ПХ (17 мМ).

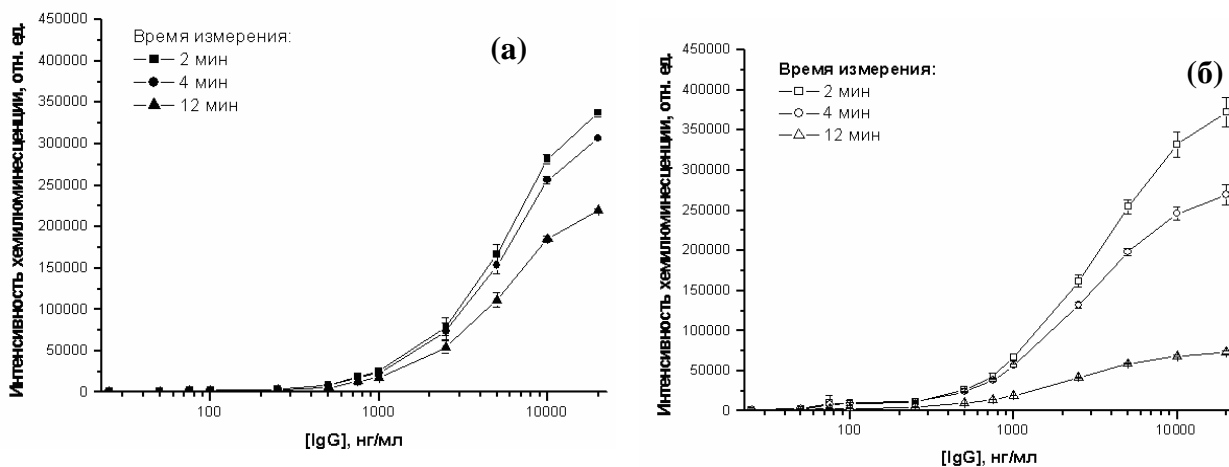
Рис. 7. наглядно демонстрирует, что активность конъюгатов ПС с антителами против IgG мыши, полученных при различных концентрациях  $\text{NaIO}_4$ , была не одинаковой. Для выяснения причин такого явления была проведена гельфильтрация полученных конъюгатов на Суперозе 12. Сравнение хроматограмм конъюгатов, синтезированных при различной концентрации  $\text{NaIO}_4$ , показывает, что увеличение концентрации окисляющего агента приводит к уменьшению площади пика, характерного для несвязанной формы ПС. Это означает, что выход конъюгата напрямую зависит от концентрации окисляющего агента.

Параллельно наблюдалось появление пиков, характерных для конъюгатов. Наличие нескольких пиков, соответствующих соединениям с высокими значениями молекулярной массы, означает, что в результате синтеза

образуется ряд конъюгатов с различным соотношением компонентов (фермент/антитело). Также следует отметить, что при наиболее низком значении концентрации окисляющего агента (8 мМ NaIO<sub>4</sub>) основной пик наблюдается для конъюгата с эквивалентным молекулярным соотношением ПС/антитело (время выхода 135 мин), в то время как при высоких концентрациях NaIO<sub>4</sub> (32 и 40 мМ) основной пик наблюдается для конъюгатов с более высокой молекулярной массой (время выхода 80 минут).

Основываясь на полученных результатах, дальнейшая работа проводилась с использованием конъюгата ПС, синтезированного при концентрации 32 мМ NaIO<sub>4</sub>. В хИФА данный конъюгат сравнивали с аналогичным конъюгатом ПХ, синтезированным по стандартной методике при концентрации NaIO<sub>4</sub>, равной 17 мМ. Состав субстратной смеси, используемой для хемилюминесцентного детектирования в случае конъюгата ПС, был оптимизирован ранее (П.2.), в то время как для конъюгата на основе ПХ использовали стандартный состав субстратной смеси. Здесь ещё раз следует отметить, что для эффективного катализа реакции окисления люминола пероксидом водорода как для ПС, так и для других анионных пероксидаз, не требуется присутствия усилителей.

На рисунке 8. представлены результаты определения IgG мыши методом хИФА при использовании конъюгатов ПС и ПХ с антителами против IgG



**Рис. 8.** Градуировочные графики определения концентрации IgG мыши «сэндвич»-методом ИФА с хемилюминесцентным детектированием при использовании конъюгатов антител кролика против IgG мыши с пероксидазами сои (а) и хрена (б).

мыши. Для каждого опыта были проведены параллельные измерения (n=6), для холостых опытов было проведено 10 параллельных измерений.

Для нахождения аналитических характеристик определения IgG мыши была проведена статистическая обработка полученных результатов. Статистические данные представлены в таблице 15.

**Таблица 15. Аналитические характеристики «сэндвич»-метода ИФА определения IgG мыши с хемилюминесцентным детектированием**

Пероксидаза	Линейный диапазон, нг/мл	Предел обнаружения, нг/мл	Sr, %
<i>Время измерения 2 минуты</i>			
ПС	100 + 10 000 (R <sup>2</sup> 0.996)	25	10.8
ПХ	200 + 3 000 (R <sup>2</sup> 0.996)	25	11.3
<i>Время измерения 4 минуты</i>			
ПС	100 + 10 000 (R <sup>2</sup> 0.996)	25	11.0
ПХ	200 ÷ 2 500 (R <sup>2</sup> 0.995)	25	11.1
<i>Время измерения 12 минут</i>			
ПС	100 + 10 000 (R <sup>2</sup> 0.996)	25	10.7
ПХ	200 + 2 000 (R <sup>2</sup> 0.993)	25	11.2

Сравнение полученных параметров показало, что при применении конъюгата ПС значительно увеличивается линейный диапазон определяемых концентраций IgG мыши (100 ÷ 10 000 нг/мл) по сравнению с конъюгатом ПХ (200 ÷ 2 500 нг/мл), при этом значения предела обнаружения и относительного стандартного отклонения для обоих конъюгатов были одинаковыми (таб. 15.). Увеличение линейного диапазона определяемых концентраций при определении IgG мыши с использованием конъюгата на основе ПС можно объяснить более высокой стабильностью ПС к радикальным продуктам окисления люминола. Данное явление было подробно описано в П.2. при изучении пероксидазного катализа окисления люминола пероксидом водорода и характерно для всех изученных анионных пероксидаз. Таким образом, пероксидаза в составе конъюгата сохраняет высокую стабильность, характерную для нативного фермента.

Особенно следует отметить стабильность хемилюминесцентного сигнала для конъюгата на основе пероксидазы сои. Как показано на рис. 4.4.4., вид градуировочного графика меняется для определения IgG мыши с течением времени. Однако, если в случае ПС наблюдается лишь незначительное падение интенсивности сигнала после 12 минут реакции окисления, а линейный диапазон определяемых концентраций сохраняет свои значения (100 – 10 000 мМ), то для ПХ интенсивность хемилюминесцентного уменьшается на порядок за тот же промежуток времени и происходит сокращение верхнего предела линейного диапазона с 3 000 до 2 000 мМ (табл. 15.). Ранее было показано, что ПХ инактивируется под действием образующихся радикальных продуктов окисления усилителей. Данное явление наиболее характерно при определении высоких концентраций определяемого вещества, а, следовательно, и концентрации пероксидазной метки. В итоге с течением времени такая высокая скорость снижения интенсивности излучения сигнала для высоких концентраций пероксидазной метки приводит к уменьшению линейного диапазона в области высоких концентраций (табл. 15.).



## ВЫВОДЫ

1. Используя кожуру клубней батата (*Ipomoea batatas*) была выделена до гомогенного состояния анионная пероксидаза. Очистка пероксидазы проводилась включала следующие стадии: гомогенизация, экстракция пигментов с помощью 2-х-фазной системы, включающей полиэтиленгликоль и сульфат аммония, гидрофобную хроматографию на Фенил-сефарозе и ионнообменную хроматографию на ДЭАЭ-тоеперле. Чистота препарата была подтверждена с помощью SDS-электрофореза в денатурирующих условиях и изоэлектрофокусированием.
2. Молекулярная масса и изоэлектрическая точка пероксидазы батата равны 37000 Да и 3.5 соответственно; удельная активность, измеренная в отношении гваякола, - 4900 ед/мг белка. Электронный спектр пероксидазы батата совпадал с типичным спектром гем-содержащих пероксидаз растений. Показано, что субстратная специфичность пероксидазы батата, изученная в отношении феруловой кислоты, гваякола, о-фенилендиамина, о-дианизидина, 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) аммония и пирокатехина, отлична от субстратной специфичности других пероксидаз растений.
3. Изучено влияние условий проведения реакции (рН и концентрации реагирующих соединений и буфера) окисления люминола пероксидом водорода, катализируемой пероксидазами пальмы, батата и сои, на интенсивность хемилюминесценции. Показано, что максимальная хемилюминесценция регистрируется при рН 8.3, 8.4 и 7.8 в случае использования пероксидазы пальмы, сои и батата соответственно. Продемонстрировано, что эффективность катализа исследованных анионных пероксидаз практически не зависит от наличия в реакционной среде «усилителей» (4-иодфенола и 4-гидроксикоричной кислоты). Предел чувствительности определения пероксидаз пальмы, сои и батата по реакции окисления люминола пероксидом водорода составил 1 пМ, 0.3 пМ и 0.01 пМ, соответственно. Особенностью анионных пероксидаз растений является стабильность производимого ими при окислении люминола хемилюминесцентного сигнала, что позволяет говорить о перспективности применения этих новых ферментов в аналитической практике.
4. Показано, что комплексы рутения(II) с общей формулой  $[Ru^{II}(C\sim N)(N\sim N)_2]PF_6$ , где  $C\sim N$  = 2-фенилпиридин или 2-(4'-толил)пиридин, а  $N\sim N$  = 2,2'-бипиридин, 1,10-фенантролин или 4,4'-диметил-2,2'-бипиридин, легко окисляются  $H_2O_2$  в присутствии пероксидаз пальмы, батата и хрена. Все ферменты окисляют изученные комплексы рутения с одинаковой эффективностью. Найдено, что синтезированные рутенивые комплексы являются прекрасными

метиаторами в пероксидазном катализе «плохих» субстратов, что было показано на примере изучения реакции окисления пирокатехина.

5. Изучены пероксидазы пальмы, хрена и батата, как активные компоненты ферментных электродов с прямым и медиаторным переносом электронов. Показано, что биосенсоры для определения  $H_2O_2$  на основе пероксидазы пальмы обладали наиболее высокой чувствительностью, более широким рабочим диапазоном и повышенной операционной стабильностью и стабильностью при хранении. Исследования по рН-зависимости сигнала биосенсоров продемонстрировали, что электроды, модифицированные пероксидазой пальмы, сохраняют способность детектировать  $H_2O_2$  при кислых условиях (рН 3-4). Найдено, что конструирование ферментных электродов с медиаторным переносом электронов приводит к значительному увеличению чувствительности и стабильности биосенсоров для всех изученных пероксидаз.
6. На основе пероксидазы пальмы/хрена и алкогольоксидазы конструированы двухслойные биферментные биосенсоры для определения этанола. При создании чувствительного слоя биосенсора ферменты разного типа включались в разные слои электропроводящих полимеров. Сравнение биферментных биосенсоров на основе пероксидазы пальмы показало преимущество перед пероксидазой хрена: более высокая чувствительность, более широкий линейный диапазон определяемых концентраций этанола, большая операционная стабильность. Полученные биосенсоры протестированы для контроля качества вина. Результаты биоэлектрохимического анализа для реальных образцов вина показали хорошую корреляцию с спектрофотометрическим и рефрактометрическим методами, используемыми в настоящее время в виноделии.
7. Оптимизирован периодатный метод синтеза иммуноконъюгата пероксидазы сои и антител против иммуноглобулина G мыши. На примере разработанной тест-системы для определения IgG мыши продемонстрирована перспективность использования анионной пероксидазы сои в ИФА с хемилюминесцентной детекцией как ферментного маркера. Сравнения конъюгатов используемых антител с пероксидазами сои и хрена показало, что в случае пероксидазы сои в условиях реального анализа затухание образующегося хемилюминесцентного сигнала протекало значительно медленней. Применение конъюгата с пероксидазой сои позволило повысить чувствительность и рабочий диапазон изучаемой тест-системы.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

- 1) Leon J.C., **Alpeeva I.S.**, Chubar T.A., et al., Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers, *Plant Science*, 2002, 163 (5), 1011-1019.
- 2) **Alpeeva I.S.**, Soukharev V.S., Alexandrova L., et al., Cyclometalated ruthenium(II) complexes as efficient redox mediators in peroxidase catalysis, *Journal of biological inorganic chemistry*, 2003, 8 (6), 683-688.
- 3) **Alpeeva I.S.**, Sakharov I.Y., Soybean peroxidase-catalyzed oxidation of luminol by hydrogen peroxide, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, 53 (14), 5784-5788.
- 4) **Alpeeva I.S.**, Niculescu-Nistor M., Leon J.C., et al. Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring, *Biosensors and Bioelectronics*, 2005, 21(5), 742-748.
- 5) **Alpeeva I.S.**, Vilkanauskyte A., Ngounou B., et al. Bi-enzyme alcohol biosensors based on genetically engineered alcohol oxidase and different peroxidases, *Microchimica Acta*, 2005, 152 (1-2), 21-27.
- 6) **Алпеева И.С.**, Сахаров И.Ю., Окисление люминола, катализируемое пероксидазой, выделенной из листьев королевской пальмы, *Прикладная биохимия и микробиология*, 2007, 43 (1), 31-35.
- 7) Sakharov I.Y., **Alpeeva I.S.**, Efremov E.E., Use of soybean peroxidase in chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay, *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006, 54 (5), 1584-1587.
- 8) **Alpeeva I.S.**, Sakharov I.Y., Lumonol-hydrogen peroxide chemiluminescence produced by sweet potato peroxidase, *Luminescence*, 2006, 21, in print (available online: [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/bio.931).
- 9) Sakharov I.Yu., Vesga B.M.K., Bovin N.V., Roig M.G., Sakharova I.V., **Alpeeva I.S.**, Bautista A.G. Isolation and some properties of thermostable peroxidase from royal palm tree leaves. *Proc. Internat. Conf. Biocatalysis-2000*, 10-15 June, Moscow, Russia, p.150
- 10) **Alpeeva I.S.**, Alexandrova L., Gazaryan I.G., Ryabov A., Sakharov I.Yu. Ruthenium-Organic Complexes are Efficient Redox Mediators of Plant Peroxidases. *Proc. Intern.conf. Biocatalysis-2002*, June 22-27, 2002, Moscow, Russia, p.66-67
- 11) **Alpeeva I.S.**, Alexandrova L., Gazaryan I.G., Ryabov A., Sakharov I.Yu. Cyclometalated Ruthenium (II) Complexes As Efficient Redox Mediators in Peroxidase Catalysis. *Proc. VI Intern. Plant Peroxidase Symp.*, Murcia, Spain, July3-7, 2002, S2-P9
- 12) **Alpeeva I.S.**, Castillo Leon J., Chubar T.A., Galaev I.Yu., Csoregi E., Sakharov I.Yu. Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers *Proc. VI Intern. Sym. Biotechnology– state of the art and prospects of development*, Moscow, Russia, October 14 -18, 2002, C.6.23
- 13) **Alpeeva I.S.**, Nistor M., Castillo Leon J., Csoregi E., Sakharov I.Yu. Biosensors for determination of hydrogen peroxide with improved parameters based on palm tree peroxidase. *Proc. VII Intern. Sym. Biotechnology– state of*

- the art and prospects of development*, Moscow, Russia, November 10 -14, 2003, v.2, p.194-195
- 14) **Alpeeva I.S.**, Niculescu-Nistor M., Castillo Leon J., Csoregi E., Sakharov I.Yu. Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide and glucose monitoring. *Proc. 18 Intern. Symp. On Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 14-19 June 2005, Coimbra, Portugal, P-123
  - 15) Берлина А.Н., **Алпеева И.С.**, Жердев А.В., Дзантиев Б.Б., Сахаров И.Ю. Иммуноферментный анализ сульфаметоксипиридазина с помощью биотин/стрептавидиновой пары. *Труды междунар. конф. Биотехнология и медицина*, Москва, Россия, 14-17 марта 2006, p. 247
  - 16) **Alpeeva I.S.**, Berlina A.N., Zherdev A.V., Efremov E.E., Dzantiev B.B., Sakharov I.Yu. Advantages of application of anionic soybean peroxidase in chemiluminescent ELISA. *Proc. Intern. Congress on Analytical Sciences*, Moscow, Russia, 25-30 June 2006, 137-138