

УДК 577.15.08 :543.25

ДИНАМИКА И МЕТРОЛОГИЯ ФЕРМЕНТНОГО БИОСЕНСОРА

© 1995г. Н.В. Седых

Ветеринарный институт, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 10.10.94

Проведено моделирование динамики обобщённого ферментного биосенсора. На основании моделирования сформулированы требования к конструкции и режимам работы сенсора. Приведены результаты исследований метрологических показателей ферментных биосенсоров.

Биосенсоры, где в качестве основного чувствительного элемента используются иммобилизованные ферменты, находят все более широкое применение в биотехнологии, экологии и медицине для экспресс-анализа состава сложных гетерогенных сред [1-3]. Однако количественных исследований функционирования биосенсоров как информационно-измерительных систем в настоящее время крайне мало.

Ниже приведены результаты исследований динамики ферментного биосенсора методом математического моделирования и приведены некоторые данные по их метрологии.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДИНАМИКИ ОБОБЩЕННОГО ФЕРМЕНТНОГО БИОСЕНСОРА

Для выбора оптимальных режимов работы биосенсора необходимо исследовать динамику процессов, происходящих в нем. Для этих целей используем метод математического моделирования, а именно, описание динамики процессов в биосенсоре системой точечных интегродифференциальных уравнений.

Введем следующие обозначения: $C(t)$ – концентрация анализируемого соединения (субстрата) в анализируемом потоке в момент времени t в биосенсоре; C_0 – его концентрация на входе в биосенсор; $A(t)$ – активность иммобилизованных в биосенсоре ферментов в момент времени t ; Φ_0 – концентрация этих ферментов в единице объема ра-

бочей зоны биосенсора; Ψ – проницаемость активной (рабочей) зоны биосенсора, которая представляет твердую пористую среду с иммобилизованными на стенках ферментами; V – скорость фильтрации анализируемого раствора (суспензии) через активную зону биосенсора; A_0 – начальная активность иммобилизованных ферментов.

В биосенсоре имеют место две стадии преобразования входного сигнала. Первая стадия реализуется с помощью фермент-субстратной реакции, когда анализируемое вещество X преобразуется в вещество Y . На второй стадии количественное содержание вещества Y преобразуется в электрический сигнал. Считаем, что на первой стадии не образуется более двух видов вещества Y . Примем, что $C_{n_1}(t)$ – концентрация продукта первого вида в момент времени t , а $C_{n_2}(t)$ – концентрация продукта реакции второго вида в момент времени t . Далее введем: k_1 – коэффициент скорости ферментативного катализа, k_2 – коэффициент снижения ферментативной активности во времени; k_3 и k_4 – коэффициенты скорости образования продуктов первого и второго видов, соответственно. Тогда, динамика процесса в ферментном датчике может быть описана следующей си-

стемой дифференциальных уравнений

$$\begin{cases} \dot{C} &= \Psi V C_0 - k_1 A C \Phi_0, \\ \dot{A} &= -k_2 \Psi V A_0 \int_0^t C(t_1) dt_1, \\ \dot{C}_{n_1}(t) &= k_3 C_{n_1} C \Phi_0 - \Psi V C_{n_1}, \\ \dot{C}_{n_2}(t) &= k_4 C_{n_2} C \Phi_0 - \Psi V C_{n_2}; \end{cases}$$

с начальными условиями

$$\begin{aligned} C(0) &= \tilde{C}_0; & A(0) &= \tilde{A}_0; \\ C_{n_1}(0) &= \tilde{C}_{n_1 0}; & C_{n_2}(0) &= \tilde{C}_{n_2 0}. \end{aligned}$$

Сделаем следующую замену переменных:

$$\begin{aligned} x_0 &= \tilde{C}_0 / C_0; & y_0 &= \tilde{A}_0 / A_0; \\ x(t) &= C(t) / C_0; & a &= \Psi V; \\ y &= A(t) / \tilde{A}_0; & z_1(t) &= C_{n_1}(t); \\ z_2(t) &= C_{n_2}(t); & k_1 &= \tilde{k}_1 \Phi_0 A_0; \\ k_2 &= \tilde{k}_2; & k_3 &= \tilde{k}_3 C_0 \Phi_0; \\ \alpha &= C_0; & k_4 &= \tilde{k}_4 C_0 \Phi_0; \\ z_{0_2} &= \tilde{C}_{n_2}; & z_{0_1} &= \tilde{C}_{n_1 0}; \end{aligned}$$

тогда

$$\begin{cases} \dot{x} &= a - ax - k_1 xy, \\ \dot{y} &= -k_2 \alpha \int_0^t x(\xi) d\xi y, \\ \dot{z}_1 &= k_3 \alpha xy - az_1, \\ \dot{z}_2 &= k_4 \alpha xy - az_2 \end{cases} \quad (1)$$

с начальными условиями

$$y(0) = y_0; \quad z_1(0) = z_0; \quad z_2(0) = z_{0_2}. \quad (2)$$

Проведем исследование полученных интегродифференциальных уравнений.

Теорема 1 Пусть

$$\begin{aligned} x_0 \geq 0, & \quad y_0 \geq 0, \\ z_{0_1} \geq 0, & \quad z_{0_2} \geq 0. \end{aligned} \quad (3)$$

Тогда решение задачи (1) с начальными условиями (2), удовлетворяющими неравенствам (3), существует только в промежутке $[0, +\infty)$.

Теорема 2 Пусть $x(t), y(t), z_1(t), z_2(t)$ — решение задачи (1-2), тогда $x_0 > 1$.

- 1) если $x_0 > 1$, то $\dot{x}(t) < 0$ при $t \in [0, +\infty)$; $\lim_{t \rightarrow +\infty} x(t) = 1$;
- 2) если $x_0 < 1$, $a - ax_0 - k_1 x_0 y_0 < 0$, тогда существует $t^* \in [0, +\infty)$ такое, что $\dot{x}(t) < 0$ при $t \in [0, t^*)$; $\dot{x}(t) > 0$ при $t \in [t^*, +\infty)$; $\lim_{t \rightarrow +\infty} x(t) = 1$;
- 3) если $x_0 < 1$, $a - ax_0 - k_1 x_0 y_0 > 0$, то $\lim_{t \rightarrow +\infty} x(t) = 1$; $x(t) < 1$, $\dot{x}(t) > 0$ при $t \in [0, +\infty)$;
- 4) $y(t) > 0$; $y(t) < y_0$, $t \in [0, +\infty)$; $\lim_{t \rightarrow +\infty} y(t) = 0$;
- 5) $z_i(t) > 0$, $t \in [0, +\infty)$; $\lim_{t \rightarrow +\infty} z_i(t) = 0$, $i = 1, 2$;
- 6) пусть $x(t; x_0, y_0)$, $y(t; x_0, y_0)$, $z_i(t; x_0, y_0)$, $i = 1, 2$ решение задачи (1) с начальными условиями (2); пусть $x_0 \in [x_0^1, x_0^2]$, $y_0 \in [y_0^1, y_0^2]$; $y_0^2 \geq y_0 > 0$; $x_0^2 \geq x_0^1 > 0$, $T > 0$, тогда $\min x(T; x_0, y_0) = x(T; x_0^1, y_0^2)$, $x_0 \in [x_0^1, x_0^2]$, $y_0 \in [y_0^1, y_0^2]$; $\max y(T; x_0, y_0) = y(T; x_0^1, y_0^2)$, $x_0 \in [x_0^1, x_0^2]$, $y_0 \in [y_0^1, y_0^2]$.

Полное решение системы (1) получить невозможно, поэтому вычислим оценки, ограничивающие $y(t)$ сверху и снизу.

Пусть $x_0 < 1$, $\delta > 0$, $\alpha_0 > 0$, тогда существует $M = m(\delta, \alpha_0)$ такое, что $t > M$; $y_0 \exp(-\alpha k_2 t^2) < y(t) < y_0 \exp(-\delta \alpha k_2 t^2)$.

Ранее нами было доказано, что это есть граничные оценки сверху и снизу искомой функции решения $y(t)$ [4], а конкретные их значения имеют вид

$$y(t) = y_0 \exp\left(-\int_0^t \int_0^{t_1} \alpha k_2 x(\xi) d\xi dt_1\right) \leq y_0 \exp(-\delta \alpha k_2 \frac{3}{4} t^2).$$

Полученные значения оценок показывают "устойчивость" изучаемой системы уравнений, что, в свою очередь, подтверждает ее адекватность реальному физическому процессу [5]. Исследования также показали, что имеет место фазовый портрет простой структуры типа "седло" с одной устойчивой особой точкой.

Анализ системы (1) и полученных решений

посредством постановок и доказательств ряда лемм позволил выявить основной лимитирующий фактор в работе биосенсора. Этим фактором является выбор скорости фильтрации анализируемого соединения через первую рабочую зону биосенсора.

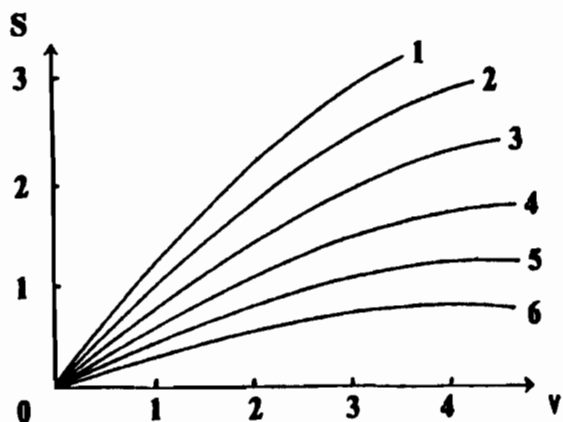


Рис.1. Расчетные зависимости чувствительности ферментного биосенсора S при различных проницаемостях Ψ и скоростях протекания V исследуемой среды через биосенсор.

1 - $\Psi = 0,1$, удельная активность фермента $A = 10^3$, объём реактора $V_p = 10$; 2 - $\Psi = 0,5$, $A = 10^2$, $V_p = 5$; 3 - $\Psi = 1$, $A = 50$, $V_p = 1$; 4 - $\Psi = 5$, $A = 10$, $V_p = 0,1$; 5 - $\Psi = 10$, $A = 1$, $V_p = 0,5$; 6 - $\Psi = 100$, $A = 0,1$, $V_p = 0,01$.

Здесь и на рис.2 размерность дана в относительных единицах.

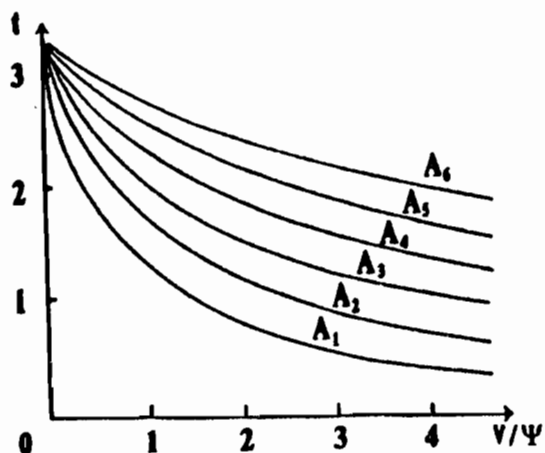


Рис.2. Расчетные зависимости времени отклика t от скорости фильтрации V/Ψ анализируемой среды при различных активностях фермента A ($A_1 > A_2 > A_3 > \dots > A_6$).

На рис.1 представлены данные числен-

ного анализа на ЭВМ полученного решения. Здесь за чувствительность S биосенсора была принята величина, равная количеству вещества M , получающегося в датчике за единицу времени при постоянстве активности фермента. Приведенное семейство кривых показывает, что чувствительность возрастает при более низкой проницаемости ферментного реактора. Это обусловлено тем, что в данном случае гидродинамические условия фильтрации благоприятствуют контакту "субстрат - фермент". При слишком высоких скоростях фильтрации чувствительность снижается вероятно за счет того, что не успевает пройти диффузия субстрата (анализируемого вещества) из основного потока в приграничную область, где располагается фермент. Исходя из этого целесообразно рекомендовать заполнение первой активной зоны биосенсора макропористой средой с сообщающимися порами.

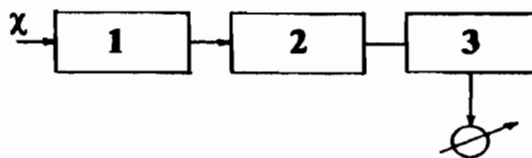


Рис.3. Блок-схема ферментного биосенсора.

1 - ферментный реактор, 2 - блок накопления сигнала и преобразования его в электрическую величину, 3 - электронное устройство, регистрирующее электрическую величину.

Чувствительность биосенсора можно повысить, если накопление вещества M вести в отдельной полости, где и вести преобразование в электрический сигнал. Иначе говоря, ферментный биосенсор надо снабдить накопительной системой. Это позволило бы осуществлять анализ при более высоких скоростях фильтрации анализируемого вещества через чувствительные зоны биосенсора и улучшить тем самым его частотную характеристику. На рис.2 приведены зависимости времени отклика биосенсора от ферментативной активности A и скорости фильтрации (V/Ψ) анализируемого вещества через биосенсор. Как видно из полученного семейства кривых, при возрастании скорости фильтрации время отклика биосенсора снижается. При этом, чем выше активность фермента, тем параметр отклика биосенсора более существенен.

ЭЛЕКТРОФИЗИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР И ЕГО МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Приведенные выше результаты исследования динамики в обобщенном ферментном биосенсоре позволяют оптимизировать конкретные технические конструкции, которые были реализованы для электрофизического биосенсора, и выполнить их по следующей схеме (рис.3).

Ферментный реактор был выполнен как серийный рН-электрод, содержащий микропористое стекло (С-80) с удельной поверхностью 60 м²/г. Удельная активность иммобилизованного реакцией азосочетания и ковалентного связывания фермента составляла 80–120 Ед/г белка на 1 см³ реактора.

Область накопления сигнала и его преобразования представляет собой полость кондуктометрического (или емкостного) датчика, где происходит преобразование параметра состава и массы вещества М в электрический сигнал, количественно регистрируемый устройством 3 (рис.3) как удельная электропроводность или диэлектрическая проницаемость. В качестве такового был взят импедансметр ВМ508, а определение импеданса проводилось в интервале частот от 1 кГц до 50 МГц. Результаты метрологических испытаний ферментного биосенсора

лизованного реакцией азосочетания и ковалентного связывания фермента составляла 80–120 Ед/г белка на 1 см³ реактора.

Таблица1. Результаты метрологических испытаний ферментных биосенсоров

Иммобилизованный фермент	Определяемое вещество в смеси	Диапазон измерений, М	Время реализации, с	Стабильность результатов сут.±%	Погрешность σ%
Лизинкарбоксилаза	Лизин	$3 \cdot 10^{-4}$ –1,8	180	25 ± 8	38,6
Лактатгидрогеназа	Молочная кислота	$1,0 \cdot 10^{-4}$ –0,8	60	38 ± 10	40,2
Малатдегидрогеназа	Щавелевая кислота	$1,7 \cdot 10^{-3}$ –1,2	60	20 ± 7	28,2
Глюкозооксидаза	Глюкоза	$1,0 \cdot 10^{-4}$ –3	25	48 ± 7	21,2

Примечание. Погрешность σ представляет суммарную приведенную аддитивную и мультипликативную дисперсию от действия влияющих факторов.

Таблица2. Оценка значимых факторов, влияющих на работу ферментного биосенсора

Влияющий фактор	Исходные данные		Результаты определений		
	Диапазон изменений	σ_i^2	$\beta_i, \%$	D_i	α_i
Активность фермента	50–200, ед/г	20, (ед/г) ²	1,2	0,24	1,9
Скорость потока через биосенсор анализируемой среды	0,1–10, см ³ /с	1,2 (см ³ /с) ²	1	$1,2 \cdot 10^{-2}$	0,83
Температура	293–308, К	801, К ²	0,02	$16 \cdot 10^{-2}$	0,6
рН среды	6,2–7,8	0,8	0,03	$2,4 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$

Примечание. σ_i^2 – дисперсия независимых переменных; β_i – коэффициент регрессии по каждому параметру; D_i – общая дисперсия для i-го параметра; α_i – относительное значение доли i-й переменной в общей дисперсии D.

приведены в табл.1 и 2.

Данные табл.1 показывают, что ферментные биосенсоры обладают высокой селективностью и чувствительностью к определяемым соединениям в сложной смеси. Как видно из приведенных в табл.2 данных, ферментный биосенсор характеризуется достаточно значительным влиянием ряда факторов на результаты измерений. В большей степени на полученные данные влияют нестабильность ферментативной активности и скорость потока анализируемой среды.

Полученные данные позволяют рекомендовать стабилизировать работу биосенсора в следующих пределах, по параметрам: активности фермента - $\pm 10\%$, скорости фильтрации анализируемой среды - $\pm 5\%$, температуры - $\pm 1\%$, pH - $\pm 8\%$. При таких условиях функционирования ферментные биодатчики с электрофизической регистрацией дают уникальную возможность исследовать состав сложного вещества, чаще всего биологического происхождения, по таким компонентам, которые находятся в этих средах в

крайне малых концентрациях. Причем, анализ состава вещества делается без разрушения последнего, достаточно быстро и с удовлетворительной точностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Кулис Ю.Ю.* Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов. Вильнюс, 1981. 200 с.
2. *Евсеева Г.В.* Биодатчики: Принцип устройства и область применения. М., 1987. 31 с.
3. *Karube J.* Biosensors // *Karaku Kore, Chem. Industry (Jap.)*. 1982. Vol.33, №6. P.491-496.
4. *Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С.* Математическое моделирование в биофизике. М., 1975. 342 с.
5. *Sedych N.* Biosensors. Jn.34 Internationales Wissenschaftliches Kolloquium. Berlin, 1989. Bd.1. S.21-22.