

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра общей и неорганической химии

Иммобилизация пероксидазы хрена на полиэлектrolитные слои

АВТОРЕФЕРАТ ВЫПУСКНОЙ КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ
БАКАЛАВРА

студентки 4 курса
направления

Института химии СГУ

04.03.01 – Химия

Института химии

Балкаевой Гульсары Галимжановны

Научный руководитель
к.х.н., доцент



Н. А. Бурмистрова

подпись, дата

Зав. кафедрой
д.х.н., проф.



С.П. Муштакова

подпись, дата

Саратов 2016

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность выпускной квалификационной работы. Разработка новых ферментативных систем позволяет усовершенствовать старые и предложить новые варианты анализа для целей здравоохранения и охраны окружающей среды, а также является одним из наиболее активно развивающихся направлений современной биотехнологии, потому что именно ферментативные методы обеспечивают высокочувствительное и селективное определение физиологически активных веществ. Поэтому поиск ферментов для аналитической биотехнологии является актуальной задачей.

Одним из наиболее широко распространенных ферментов, интерес к изучению которых с годами не ослабевает является пероксидаза. Пероксидаза — железосодержащие ферменты из класса оксиредуктаз, которые контролируют рост растений и их развитие. Уникальные свойства этого фермента обуславливают его применение в медицине, науке и технике

Хотя пероксидазы обнаруживаются в тканях практически всех растений, в настоящее время основным источником коммерчески доступной пероксидазы являются корни хрена.

Цель и задачи исследования. Целью исследования является сорбция пероксидазы хрена на полиэлектролитные слои по технологии послойного нанесения для возможного их применения в аналитической практике в качестве активных компонентов биосенсоров. Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи:**

- отработать методику иммобилизации пероксидазы хрена на слои полиэлектролита;
- осуществить выбор оптимального цветового канала для регистрации окраски, развивающейся в результате ферментативной реакции в присутствии хромогенного субстрата;
- установить условия нанесения бислоя полиэлектролит/пероксидаза хрена;

- изучить сорбцию пероксидазы хрена на поверхность полистирола и стекла.

Методы исследования. Для решения поставленных в работе задач применяли иммунохимический метод анализа (твердофазный иммунохимический анализ на полистирольных планшетах).

Структура и объем работы. Работа состоит из введения, двух глав, заключения, списка правил по технике безопасности и списка литературы. Работа изложена на 48 страницах, содержит 20 таблиц, 16 рисунков, список литературы из 60 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования.

Глава 1. Обзор литературы

В данной главе представлен обзор литературы, в котором рассмотрены общие сведения о структуре и свойства пероксидазы хрена, описание реакционного цикла гем-содержащих пероксидаз и их классификация, роль кальция в структуре и активности растительных пероксидаз. Приведены основные методы иммобилизации ферментов, выбор носителей и способа иммобилизации пероксидазы хрена на примере иммобилизация на кальций-альгинатном носителе. Рассмотрена суть методики технологии послойного нанесения, процесс создания пленок.

Глава 2. Экспериментальная часть

Данная глава содержит описание реагентов, используемых для проведения экспериментов. Описана методика технологии послойного нанесения.

Подбор оптимального цветового канала и концентрации пероксидазы хрена

Детектируемым сигналом пероксидазы хрена (ПХ) в пробе послужила визуально детектируемая голубая окраска пятен на лунках, образующихся после пропуска хромогенного субстрата на последней стадии проведения анализа. Голубая окраска пятен обусловлена образованием продукта ферментативного окисления хромогенного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина пероксидом водорода, согласно нижеприведённой схеме (рис. 1):

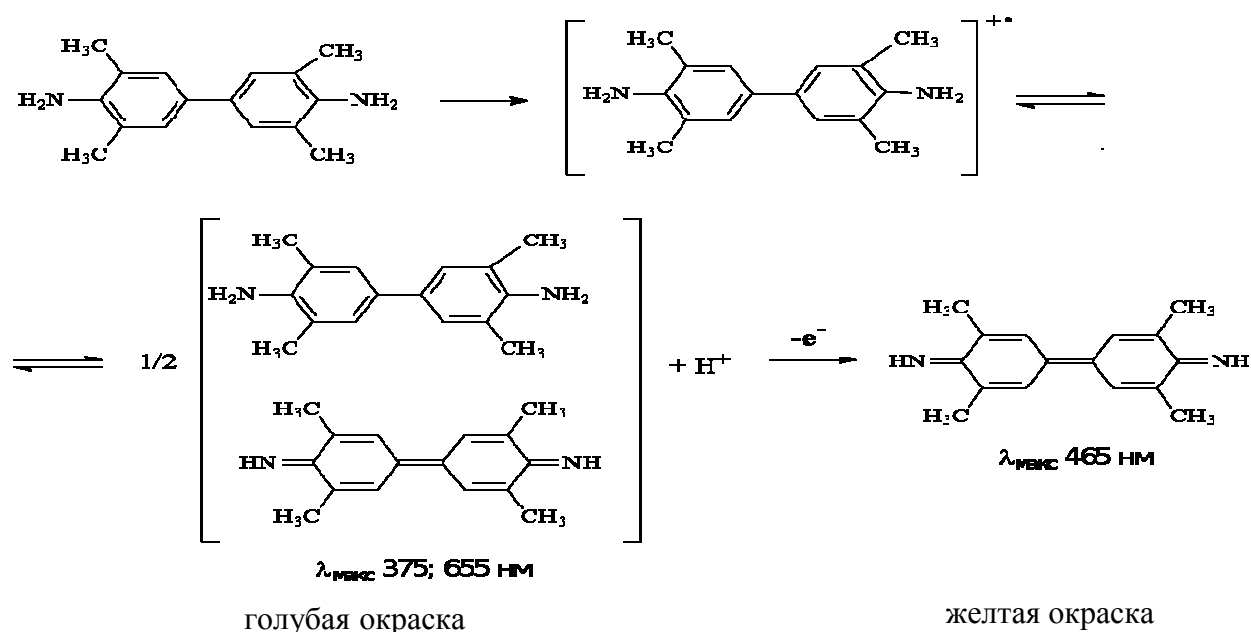
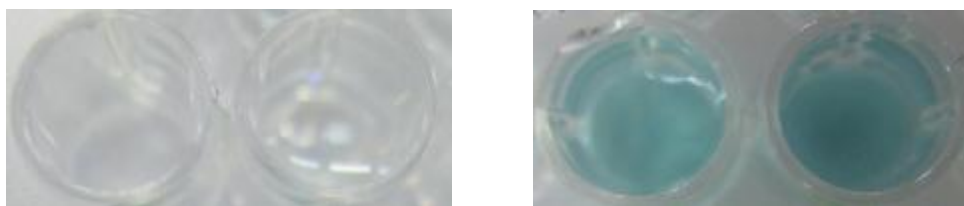


Рис. 1 Ферментативная реакция, сопровождающаяся появлением окрашенного продукта

Исследования показали, что в исследуемом диапазоне концентраций ПХ наблюдаются яркие пятна с концентрацией 1 мкг/мл, 0,1 мкг/мл. Интенсивность окраска развивалась в течение 2,5 минут (0,05 мкг/мл), что является достаточной для визуального детектирования (рис. 2)



а) ПХ 0 мкг/мл

б) ПХ 0,05 мкг/мл

Рис.2 Вид лунок при определении ПХ в модельных растворах: а) «холостая» проба (в отсутствие ПХ); б) в присутствии ПХ 0,05 мкг/мл.

Для количественной интерпретации получаемых результатов в случае применения ПХ в качестве метки проведен выбор оптимального цветового канала для регистрации окраски пятен с использованием цифрового фотоаппарата. Исследовано 2 цветовые модели: RGB и HSB.

Как видно из рис. 3, бóльшую разность между окраской фона лунки (ПХ 0 мкг/мл) и окрашенным пятном имеет параметр R по сравнению с параметром S. Параметры B, G и V (HBS) не позволяют оценить аналитический сигнал. Цветовая компонента R выбрана нами для дальнейших исследований.

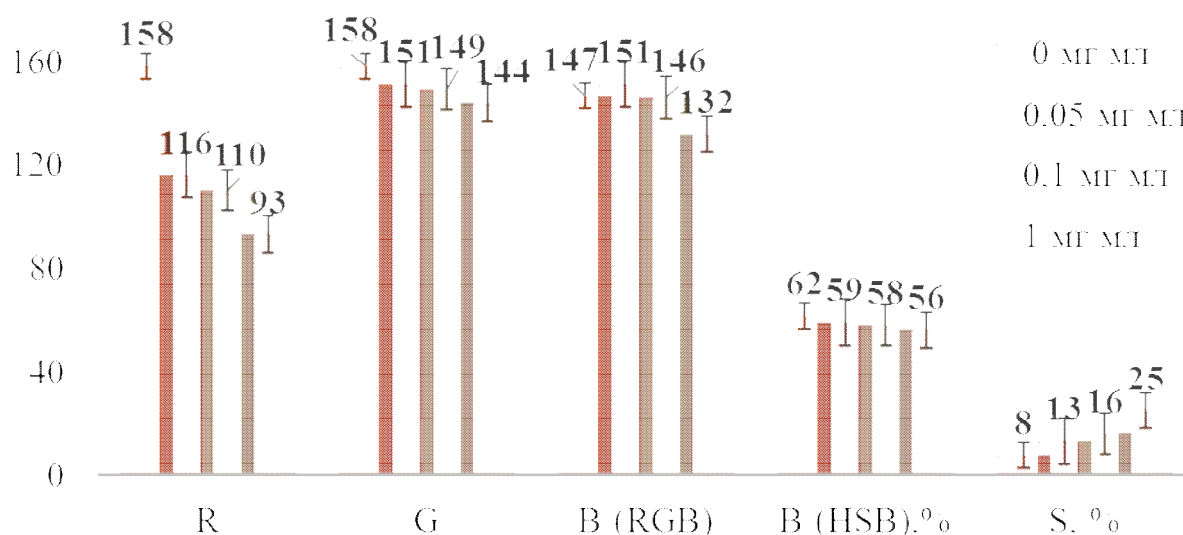


Рис. 3 Влияние концентраций пероксидазы хрена на изменение параметров R, G, B (RGB), S и B (HSB)

Подбор оптимального условия нанесения бислоя полиэлектролит/ПХ

Для реализации методики были выбраны следующие полиэлектролиты: полиэтиленимин (ПЕИ), полистиролсульфат (ПСС), полиаллиламин гидрохлорид (ПААГХ). На рис. 4 представлен вид лунок после нанесения бислоя полиэлектролит/ПХ для трех использованных полиэлектролитов.

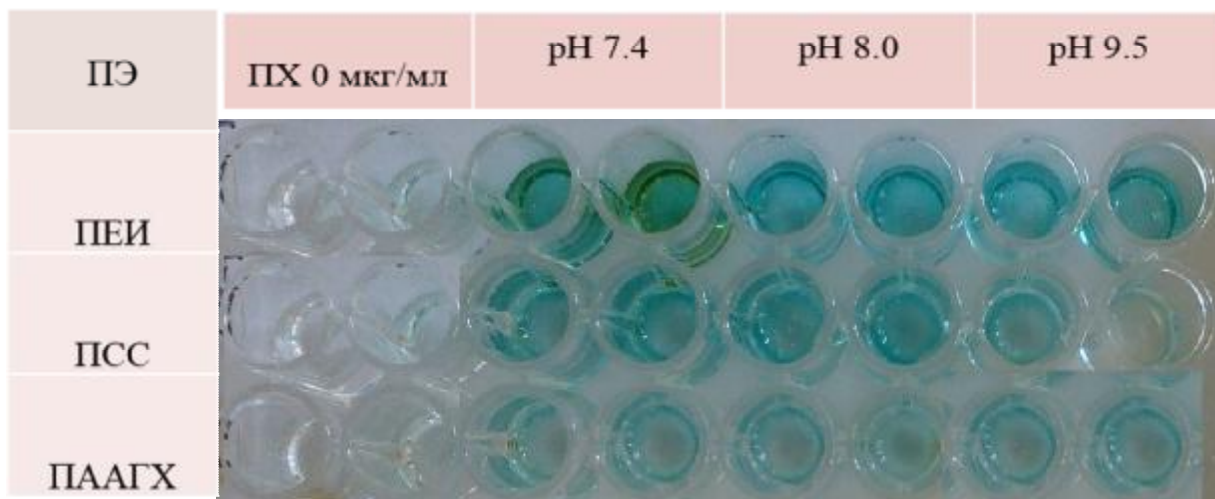


Рис. 4 Вид лунки при нанесении бислоев (pH 7,4 - 9,5): а) полиэтиленимин /пероксидаза хрена, б) полистиролсульфат /пероксидаза хрена, в) полиаллиламин гидрохлорид /пероксидаза хрена.

Как видно из рис.5 наилучшая сорбция наблюдалась при использовании полиэлектролита ПЕИ при pH 7.4. Для дальнейших экспериментов были выбраны условия: полиэлектролит ПЕИ в ФСБ (pH 7.4).

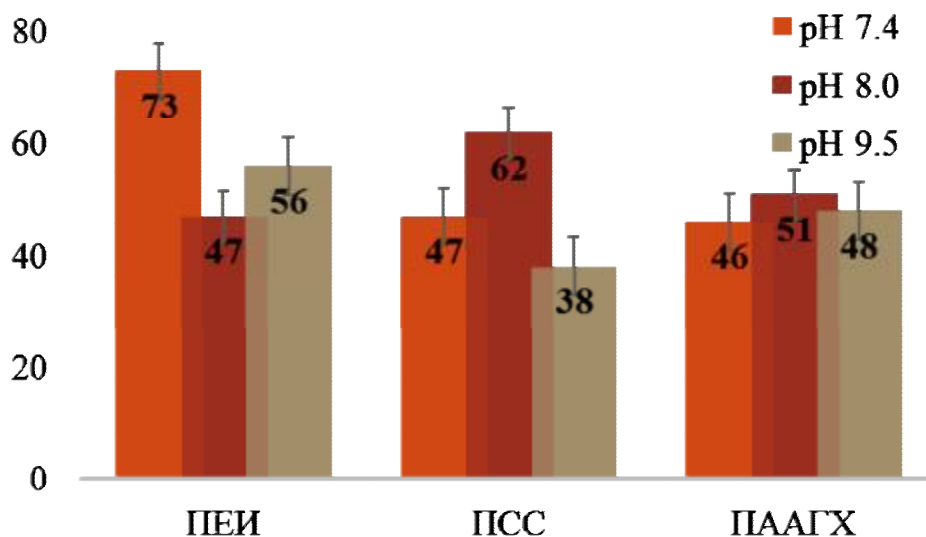


Рис. 5 Влияние полиэлектролитов и pH среды на изменение параметра R
Изучение сорбции ПХ на поверхность полистирола

В ходе работы провели 8 параллельных экспериментов. Из табл. 1 видим, что на лунках предварительно очищенных ПАБ наблюдается детектируемая голубая окраска с вероятностью 50%. (рис. 6).

Таблица 1. Определение сорбции ПХ на поверхность

ПХ 0 мкг/мл		ПХ 0,05 мкг/мл	
0	ПАБ	0	ПАБ
«-» 100%	«-» 100%	«-» 100%	«+» 50%

+Положительный результат, окраска присутствует;
 - Отрицательный результат, окраска отсутствует.

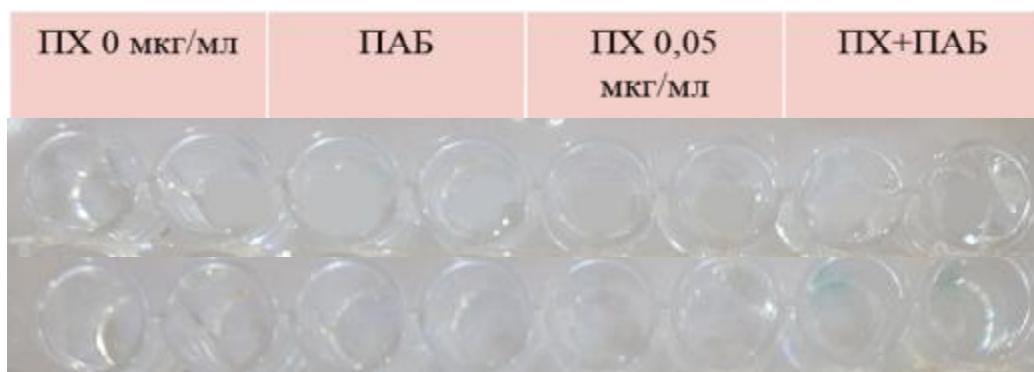


Рис. 6 Вид лунок при определении сорбции ПХ на пластиковую поверхность

Но сравнивая числовые значения (рис. 7) можно сделать вывод, что разность значений входит в величину погрешности.

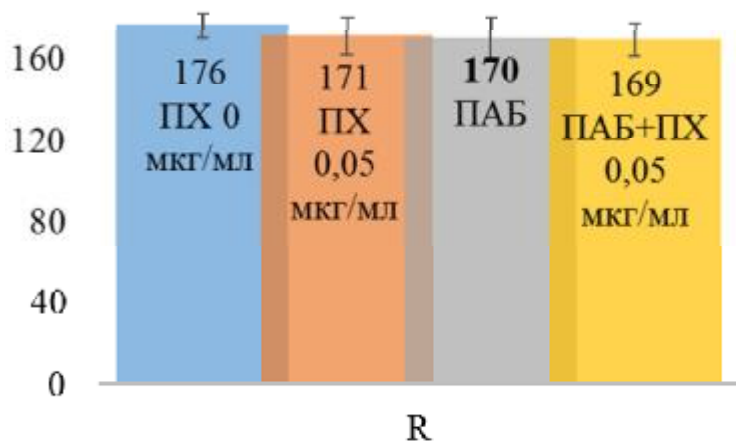


Рис. 7 Значение параметра R

Таким образом, ПХ не сорбируется на поверхность полистирола

Нанесения бислоя ПХ/ПЕИ на поверхность полистирола

Следующим этапом стала реализации методики послойного нанесения на поверхность полистирола. Пример полученных результатов представлен на рис. 8.



Рис. 8 Вид лунок при моделировании технологии послойного нанесения

Из диаграммы (рис. 9) видно, что там, где моделировали систему послойного нанесения, значительное изменение окраски. В то время как на лунках, обработанные ПАБ, этот эффект не наблюдается, что говорит о реализации данной технологии на поверхность полистирола.

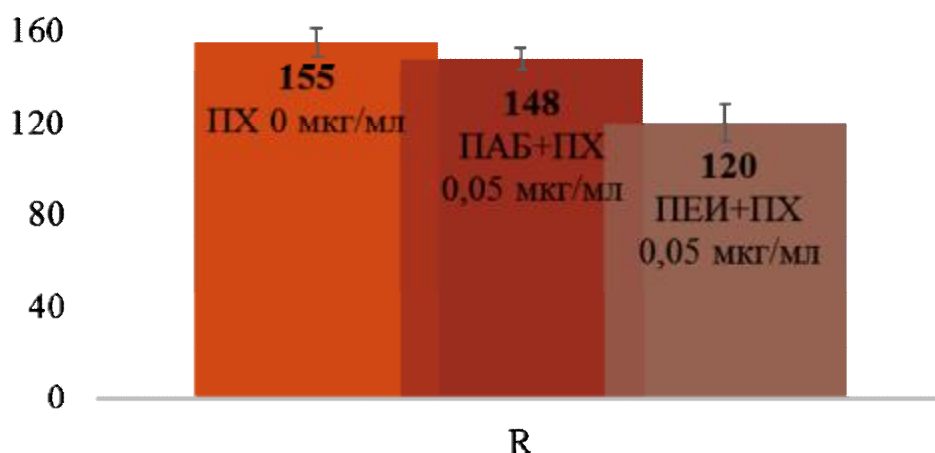


Рис. 9 Значение параметра R

Изучение сорбции ПХ на стеклянную поверхность

Для исследования сорбции ПХ на стеклянную поверхность провели ряд параллельных экспериментов: на одну пару капилляров наносили ПХ, на следующие – обрабатывали ПАБ, а на последние пара капилляр моделировали технологию послойного нанесения (табл. 2).

Таблица 2. Послойное нанесение на стеклянные капилляры

№ капилляра		Слой
С ПХ, мкг/мл		
0,05	0,1	ПХ
1	2	
3	4	ПАБ/ПХ
5	6	ПЕИ/ПХ

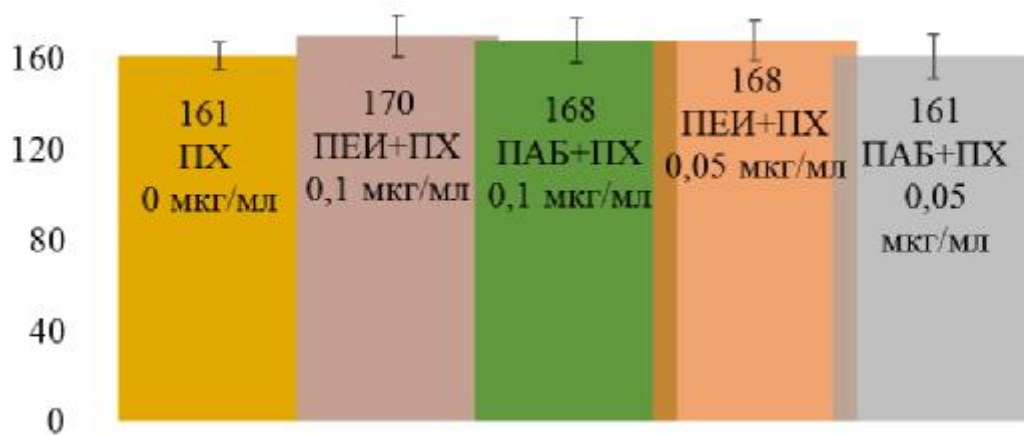


Рис. 10 Значение параметра R

Из рис. 10 видим, что значение незначительное и входит в величину погрешности. В данных условиях судить о сорбции ПХ на стеклянную поверхность невозможно.

ВЫВОДЫ

1. Проанализирована литература, посвященная иммобилизации пероксидазы хрена на полиэлектролитные слои по технологии послойного нанесения. Выявлены преимущества иммобилизованных ферментов перед нативными.
2. Определены оптимальные условия иммобилизации пероксидазы хрена методом послойного нанесения полиэлектролитов в лунки полистирольного планшета. Подобрана оптимальная концентрация пероксидазы хрена, выбран цветовой канал для регистрации окраски, развивающейся в результате ферментативной реакции с хромогенным субстратом, а также условия нанесения бислоя полиэлектролит/пероксидаза хрена.
3. Показано, что пероксидаза хрена практически не сорбируется на поверхности полистирола и стекла. Технология послойного нанесения на полиэлектролит позволяет провести иммобилизацию пероксидазы хрена