

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

**Сорбция пероксидазы хрена на полиэлектролитных
слоях**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки II курса 251 группы
направления

Института химии СГУ
04.04.01 – «Химия»

Институт химии

Жангазиевой Гульсары Галимжановны

Научный руководитель

доцент, к.х.н.,
должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

Н. А. Бурмистрова
инициалы, фамилия

Зав. кафедрой

проф., д.х.н.,
должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

Д. Г. Черкасов
инициалы, фамилия

Саратов 2018

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:

- оптимизировать методику сорбции пероксидазы хрена на слои полиэлектролита;
- установить условия нанесения слоя полиэлектролит/пероксидаза хрена;
- отработать методику сорбции пероксидазы хрена на слои полиэлектролита.

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.

Выбор оптимальной концентрации пероксидазы хрена

Детектируемым сигналом присутствия ПХ в промывных водах служила голубая окраска, возникающая после пропускания хромогенного субстрата в результате ферментативной реакции, катализируемой ПХ. Голубая окраска обусловлена образованием продукта ферментативного окисления хромогенного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина пероксидом водорода, согласно ниже приведённой схеме (рис. 1).

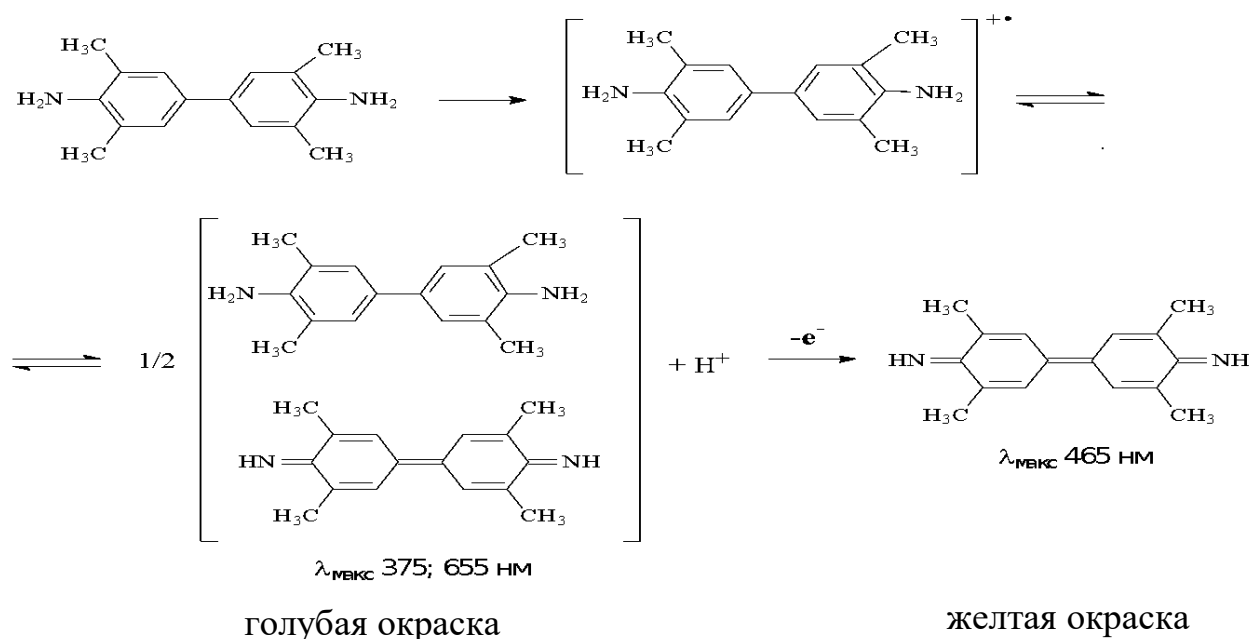


Рис. 1 Ферментативная реакция, сопровождающаяся появлением окрашенного продукта (ферментативного окисления хромогенного субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина пероксидом водорода)

На рис.2 представлен вид лунок, содержащих различные разведения ПХ после добавления хромогенного субстрата и спустя 20 мин.

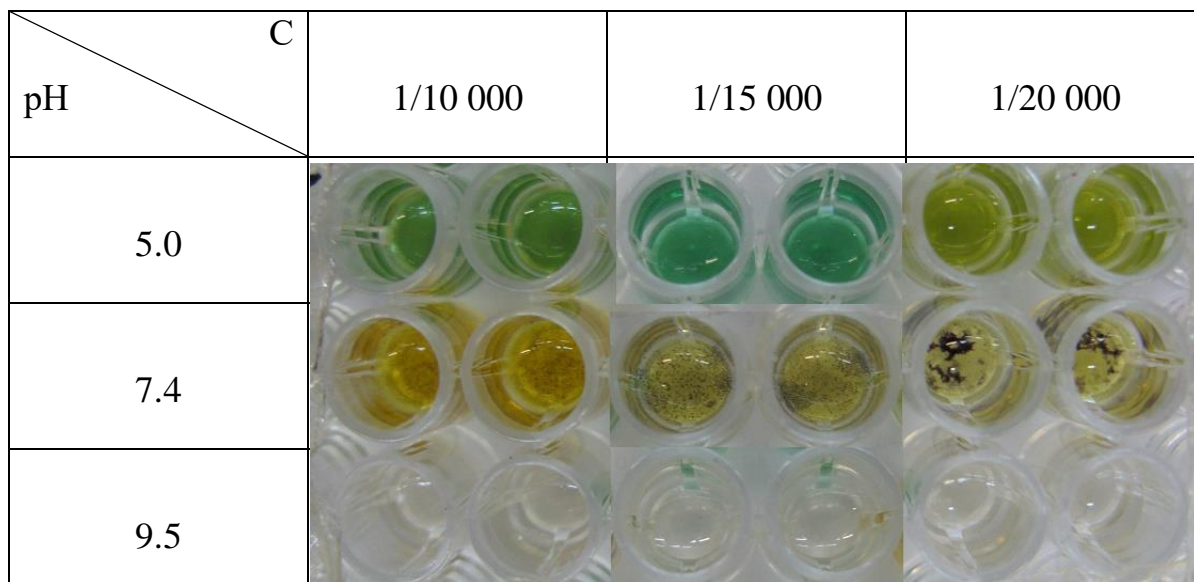


Рис. 2 Фото ПХ при разном разведении и рН после пропускании хромогенного субстрата

Далее проводили кинетический анализ при 450 нм на планшетном спектрофотометре. Из рис. 3 видно, что при использовании разведении 1/20 000 и 1/15 000 происходит накопление продуктов, т.е. не хватило ПХ, для того чтобы достигнуть максимального значения, это говорит о том, что за 5 мин реакция протекает полностью. При использовании разведении 1/10 000 окраска развивается в течение 20 минут, а после выходит на постоянную. Для дальнейших экспериментов использовали ПХ разведение 1/10 000 при рН 5.0 и 7.4.

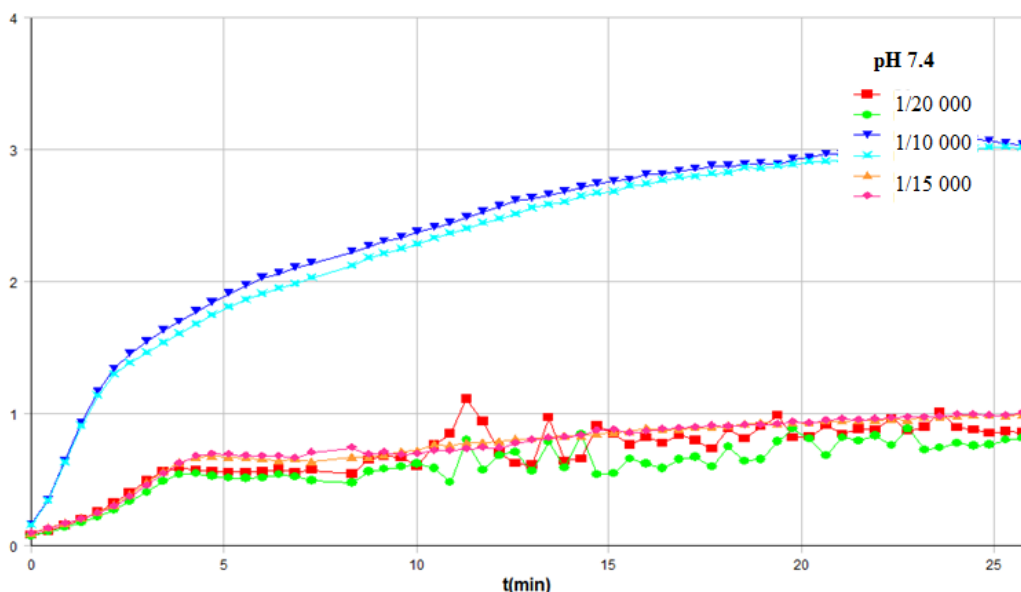


Рис. 3 Кинетическая зависимость оптической плотности (450 нм) при различных концентрациях ПХ от времени при рН 7.4

Подбор оптимального числа промывок от полиэлектролитов

После подбора оптимальной концентрации ПХ, следующая задача - оптимизация ключевых моментов, таких как условия промывки полиэлектролитного слоя от не адсорбированных молекул.

На рис.4 представлены фото полученных результатов через 20 мин после добавления хромогенного субстрата.

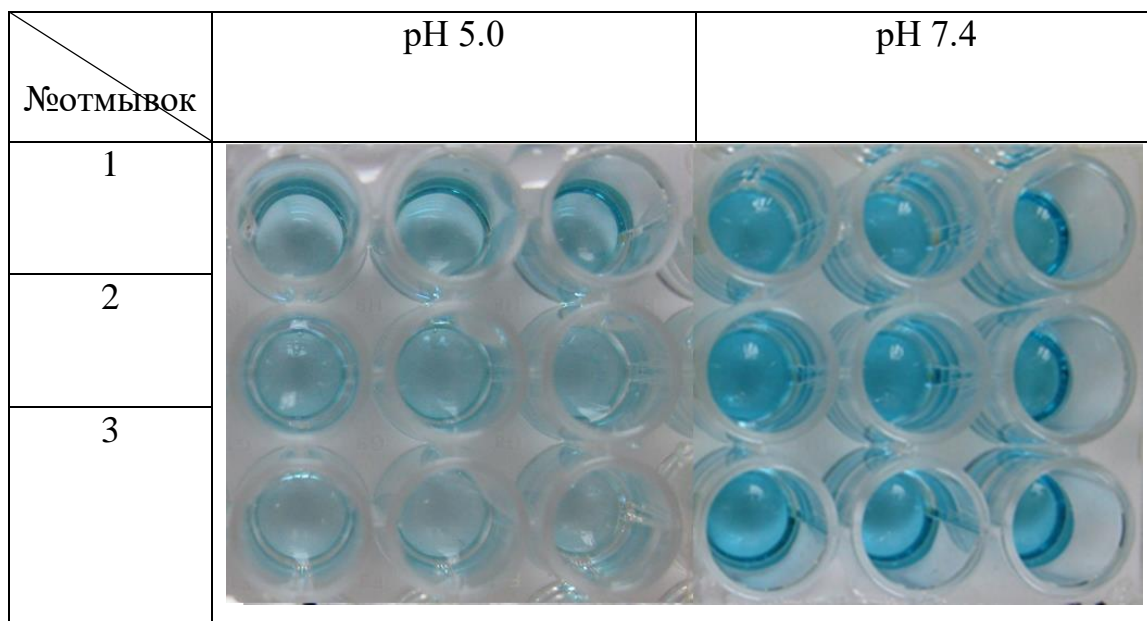


Рис. 4 Фото планшета через 20 мин после добавления хромогенного субстрата (изучение количества промывок после нанесения слоя полиэлектролита)

Полученные значения оптической плотности при 450 нм приведены в табл. 1.

Таблица 1. Значения оптической плотности ($X_{cp} \pm \Delta x$) при 450 нм, для изученных значений pH для различного количества промывок после нанесения слоя полиэлектролита

Количество отмывок	pH 5.0	pH 7.4
1	$1,9 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,3$
2	$1,7 \pm 0,1$	$3,4 \pm 0,3$
3	$1,9 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,4$

На рис.5 представлены диаграммы зависимости оптической плотности от количества промывок для изученных значений рН для различного количества промывок

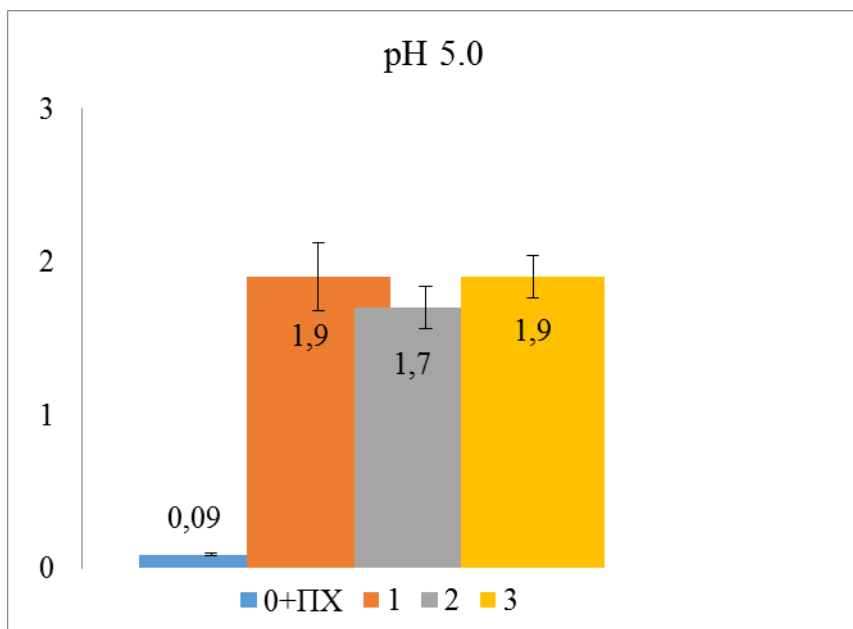


Рис. 5 Диаграмма зависимости оптической плотности от количества промывок при рН 5.0

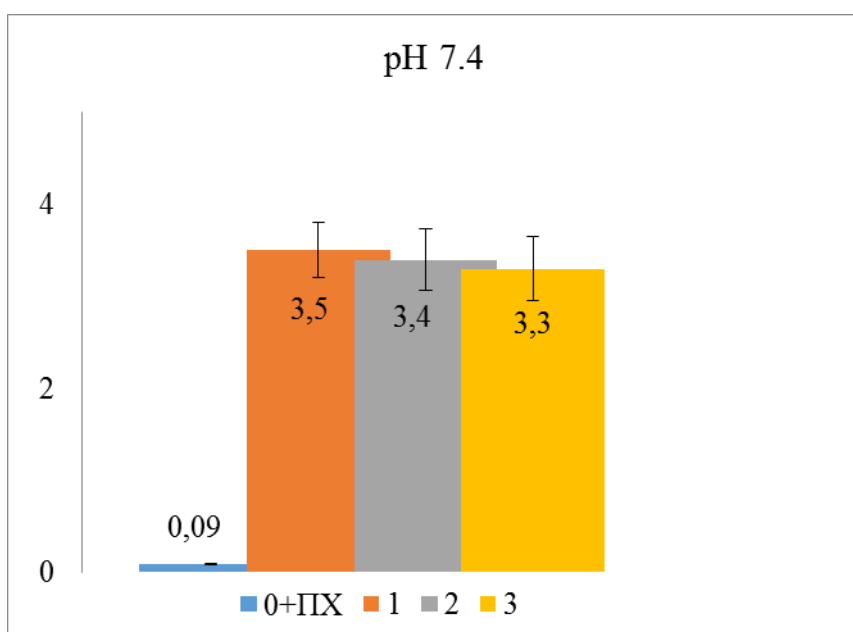


Рис. 6 Диаграмма зависимости оптической плотности от количества промывок при рН 7.4

Как видно из рис. 5-6 отмывка от не связавшихся молекул полиэлектролита не зависит от количества промываний. Таким образом, достаточной является одна отмывка от избытка полиэлектролита

Подбор оптимального числа промывок от пероксидазы хрена

Следующий ключевой момент – это подбор оптимального числа промывок от ПХ. На рис.7 представлено фото полученных результатов через 20 мин после добавления хромогенного субстрата.

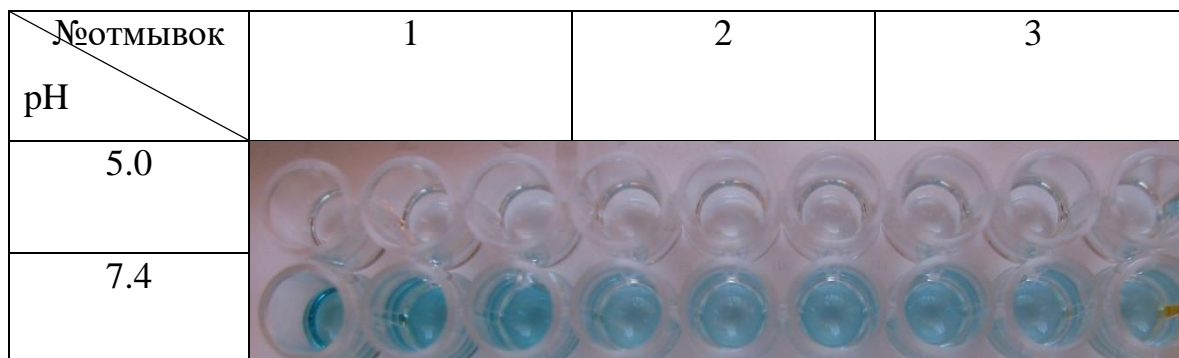


Рис. 7 Фото планшета через 20 мин после добавления хромогенного субстрата (изучение количества промывок после нанесения слоя пероксидазы хрена)

Полученные значения оптической плотности при 450 нм приведены в табл. 2.

Таблица 2. Значения оптической плотности ($X_{cp} \pm \Delta x$) при 450 нм, для изученных значений pH для различного количества промывок после введения ПХ

Количество отмывок	pH 5.0	pH 7.4
1	0,09±0,01	1,1±0,1
2	0,09±0,01	0,8±0,1
3	0,09±0,01	0,8±0,1

На рис.8 представлены диаграммы зависимости оптической плотности от количества промывок для изученных значений pH для различного количества промывок. Спустя 20 минут после проведения эксперимента, буфер 5.0 дает не достаточное развитие окраски, по сравнению с буфером 7.4.

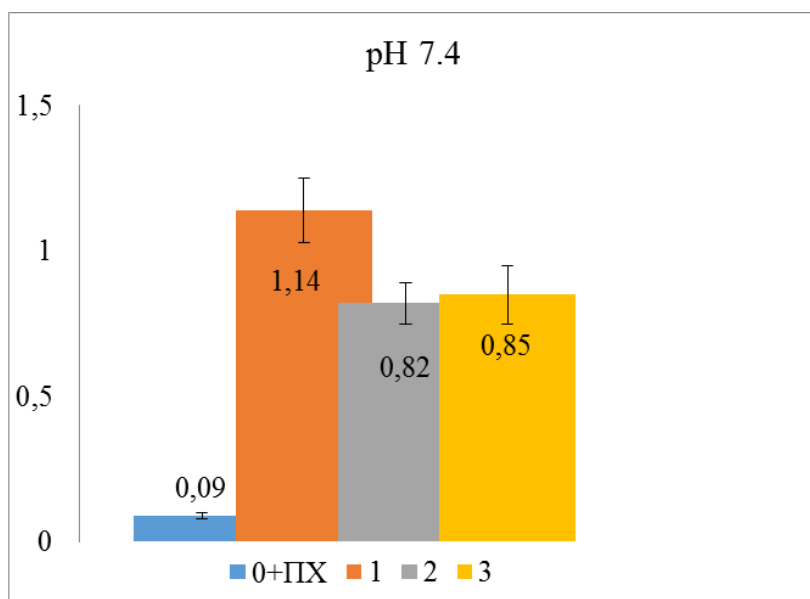


Рис. 8 Диаграмма зависимости оптической плотности от количества промывок при рН 7.4

Как видно из рис. 8, достаточной отмывкой от не связавшихся молекул ПХ соответствующим буфером являются две промывки. В ходе эксперимента выявлено, что наилучшая сорбция слоя полиэлектrolит/ПХ наблюдается при рН 7.4.

Влияние природы полиэлектrolита на сорбцию пероксидазы хрена

Оптимизировали ключевые этапы. Далее реализовали данную методику на различных системах, изучая фактор влияния природы полиэлектrolитов. На рис. 9 представлено фото полученных результатов через 20 мин после добавления хромогенного субстрата при рН 7.4

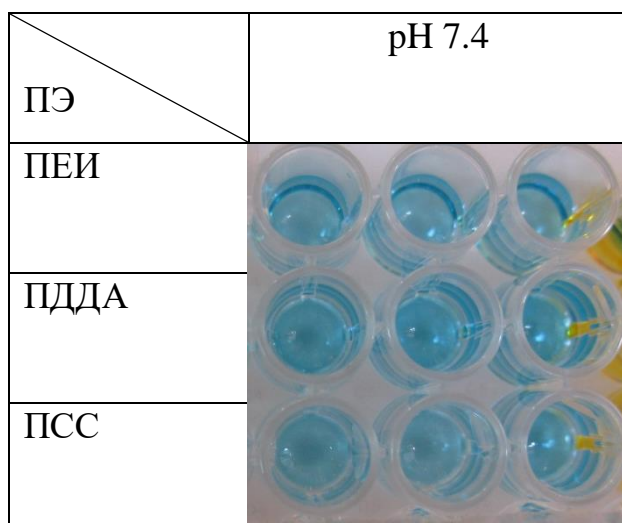


Рис. 9 Фото планшета через 20 мин после добавления хромогенного субстрата

Полученные значения оптической плотности при 450 нм приведены в табл. 3.

Таблица 3. Значения оптической плотности ($X_{\text{ср}} \pm \Delta x$) при 450 нм, для рН 7.4

Система	$X_{\text{ср}} \pm \Delta x$
ПЕИ	$1,1 \pm 0,1$
ПДДА	$1,4 \pm 0,3$
ПСС	$1,0 \pm 0,2$

На рис.10 представлены диаграммы зависимости оптической плотности от природы полиэлектролита при рН 7.4

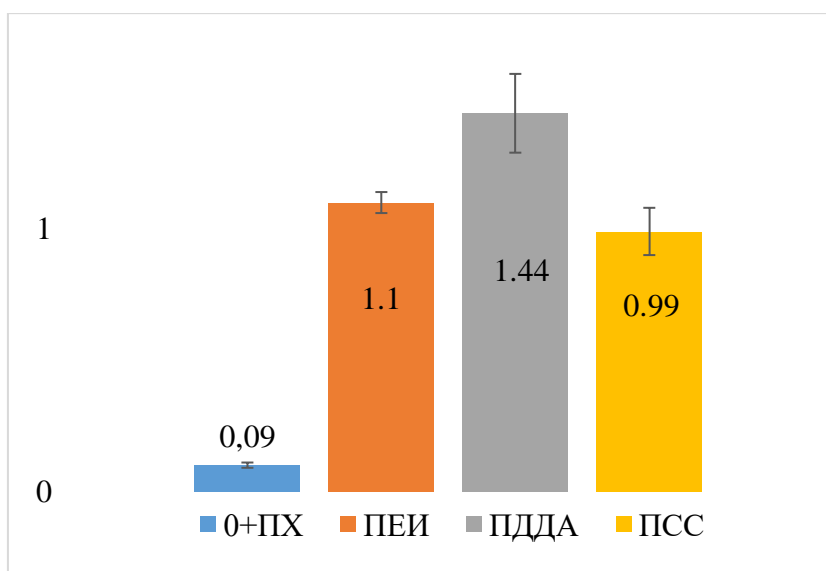


Рис. 10 Диаграмма зависимости оптической плотности от природы полиэлектролита

Из диаграммы видно, что наилучшую сорбцию показали катионные полиэлектролиты (рис.10), это связано с тем, что поликатионы модифицируют поверхность лучше полианиона, т.к. ПСС не создает на полистироле слоя необходимого качества, поэтому решили реализовать с данными полиэлектролитами двойную систему.

Влияние бислоя полиэлектролита на сорбцию пероксидазы хрена

На рис. 11 представлено фото полученных результатов через 20 минут после добавления хромогенного субстрата.

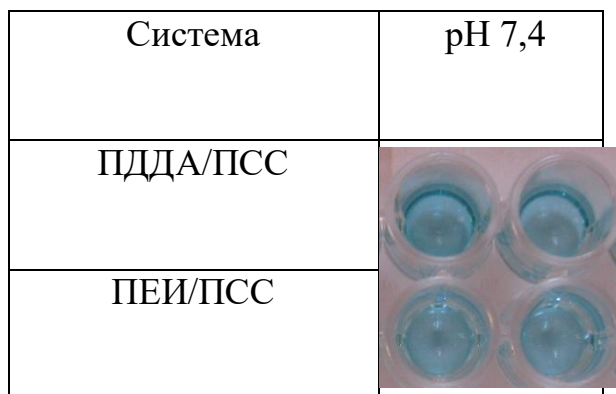


Рис. 11 Фото планшета через 20 мин после добавления хромогенного субстрата

Полученные значения оптической плотности при 450 нм приведены в табл. 4.

Таблица 4. Значения оптической плотности ($X_{\text{ср}} \pm \Delta x$) при 450 нм, для рН 7.4

Система	$X_{\text{ср}} \pm \Delta x$
ПЕИ/ПСС	$0,9 \pm 0,2$
ПДДА/ПСС	$1,0 \pm 0,2$

На рис.12 представлены сводная диаграммы зависимости оптической плотности от природы полиэлектролита при рН 7.

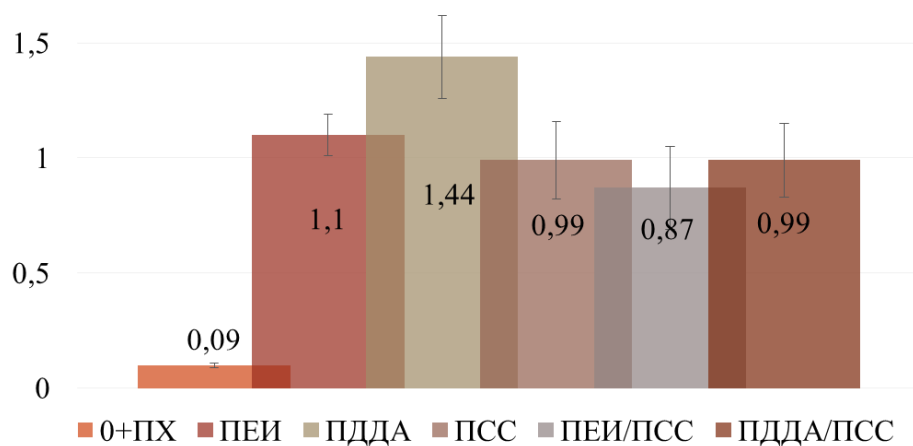


Рис. 12 Диаграмма зависимости оптической плотности от природы полиэлектролита

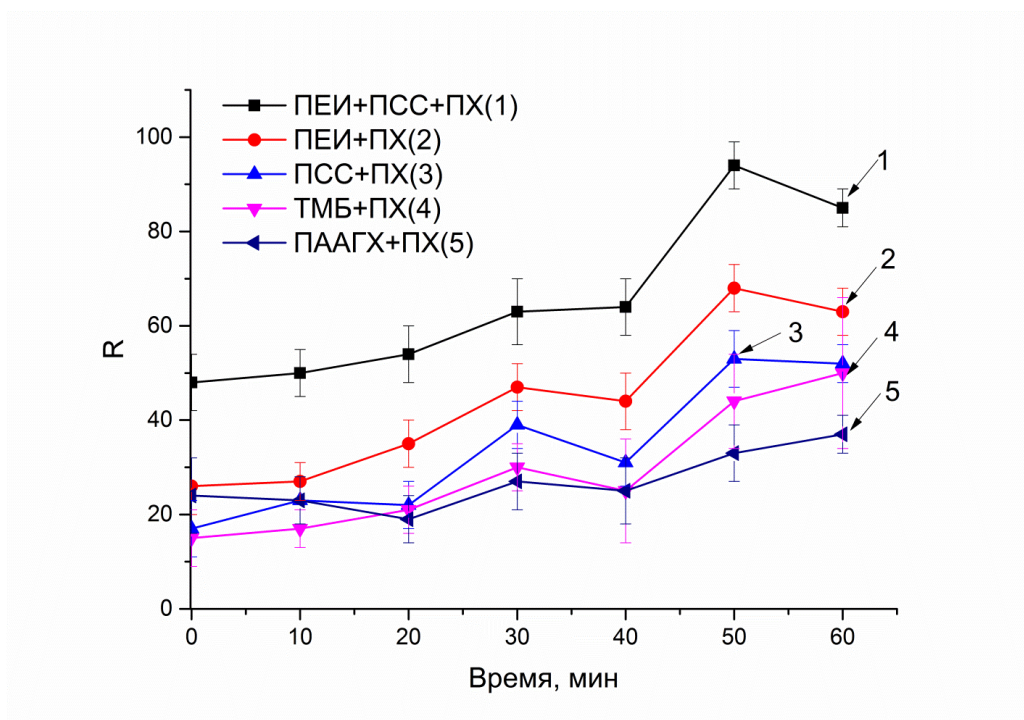
Анализируя результаты всех исследуемых систем, можно сказать, что фермент удерживается на поверхности не только за счет электростатических, но и водородных или гидрофобных взаимодействий (в литературе этот процесс до сих пор остается неясным). Реализация данной методики позволяет сорбировать ПХ на поверхность полиэлектролита. Наилучшие результаты наблюдались при катионных полиэлектролитах при рН 7.4

Изучение сорбции пероксидазы хрена на стеклянную поверхность

Изучили сорбцию пероксидазы хрена на пластиковую поверхность, но так как в дальнейшем мы будем работать с оптическими волноводами (мультикапилляр, фотонно-кристаллический волновод), в основе которых стекло, для этого нужно знать есть ли сорбция на стеклянную поверхность.

Поверхность стекла имеет условно отрицательный заряд за счет различных гидроксильных групп находящихся на поверхности, в связи с этим есть основания предполагать, что поликатионы модифицируют поверхность лучше полианиона, т.к. ПСС не создает на стекле слоя необходимого качества.

При реализации тройной системы ПЕИ/ПСС/ПХ предполагали наибольшую сорбцию ПХ связанную с решением проблемы малой толщины слоя ПСС.



А)
Б)

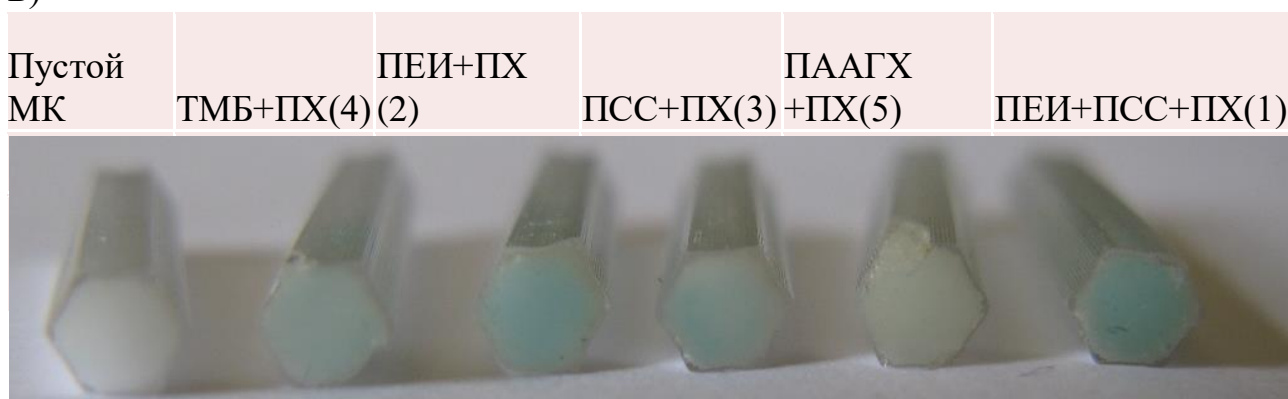


Рис.13 Зависимость ΔR от времени развития окраски образцов (А) и изображение образцов через 40 мин после начала эксперимента (Б)

Окраска образцов активно развивается в течение первого часа (рис. 13). Из данных рис. 13 (а) видно, что судить о сорбции ПХ на слоях ПААГХ и ПСС сложно, т.к. кинетические кривые этих систем идут очень близко к кривой, отвечающей развитию окраски субстрата в отсутствие слоя полиэлектrolита. Лучшая сорбция ПХ наблюдается в тройной системе ПЕИ/ПСС/ПХ. Таким образом, показано, что ПХ сорбируется на очищенную внутреннюю поверхность МК. При нанесении слоя полиэлектrolитов сорбция ПХ

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 и на стеклянную поверхность.

3. Подобрана оптимальная концентрация пероксидазы хрена, оптимальное число промывок от пероксидазы хрена и полиэлектролитов, а также условия нанесения бислоя полиэлектролит/пероксидаза хрена.