

Amperometrický enzymový biosensor

Jako příklad využití enzymů pro analytické účely byla zvolena příprava a využití biosensoru pro stanovení D-laktátu. Jeho základem je stereospecifický enzym D-laktátdehydrogenasa připravená v předchozím cvičení a imobilisovaná pomocí uhlíkové pasty. Spolu s dalšími komponentami odebírá elektrony z D-laktátu a přenáší na elektrodu pomocí mediátoru. Rychlost tohoto děje (úměrná koncentraci D-laktátu ve vzorku) se sleduje jako elektrický proud.

Úloha sestává z přípravy enzymové elektrody pro D-laktát, její kalibrace užitím známých koncentrací D-laktátu a zjištění jeho koncentrace v neznámém vzorku.

Příprava elektrody s imobilisovanou D-laktátdehydrogenasou

Elektroda je realizována jako skleněná trubička s výtlačným šroubem, naplněná uhlíkovou pastou vodivě spojenou s vývodním drátkem elektrody. V uhlíkové pastě je předem rozmíchán patřičný enzym (v našem případě D-LDH) s nosičem (použijeme Enzacryl AH, polyakrylamidový polymer modifikovaný aminoskupinami) a mediátorem přenosu elektronů z enzymu na uhlík (v našem případě použijeme sraženinu Reineckovy soli a fenazinmetosulfátu - PMS).

Příprava mediátoru:

PMS je redoxní mediátor dobře rozpustný ve vodě a samotný by se z elektrody při měření ve vodných roztocích vymýval. Proto se převede na nerozpustnou sraženinu s Reineckovou solí – $\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4]\cdot\text{H}_2\text{O}$. Připravíme 10 ml 10 mM PMS a za intenzivního míchání v kádince přisypáváme Reineckovu sůl v množství odpovídající dvojnásobku látkového množství PMS. Tvoří se oranžová sraženina, která se po 30 min. odfiltruje na fritě a promyje několika dávkami vody. Sraženina se vysuší a dá se skladovat v chladu.

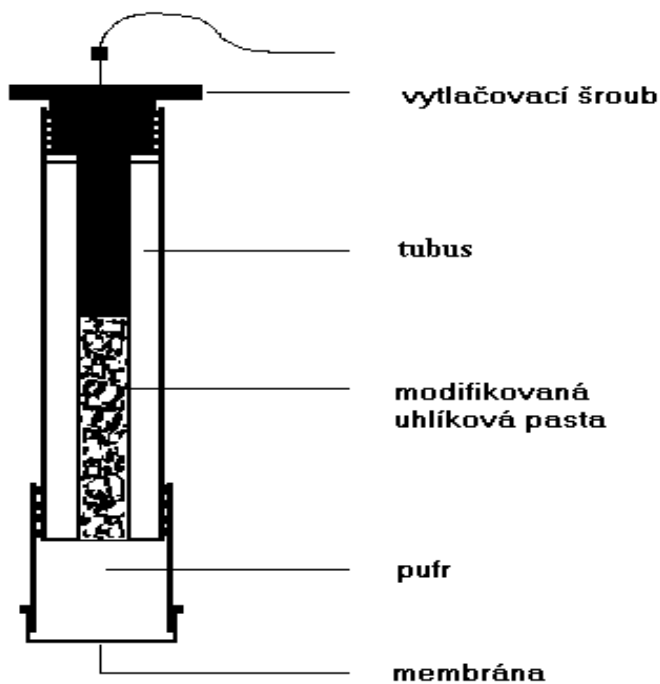
Příprava uhlíkové pasty s D-LDH a plnění elektrody:

Základní uhlíková pasta se připraví třením 2,0g grafitového prachu s 0,9ml Nujolu (parafinový olej) ve skleněné třecí misce (neglazovaný porcelán vsákne část Nujolu a změní tím poměr uhlík – Nujol). Pak se přidá 100mg Enzacrylu AH a 300mg sraženiny Reinekát-PMS. Intenzivně třeme asi 10 min do vzniku kompaktní hmoty.

Homogenní pastou naplníme elektrodové tělo (skleněnou trubičku) a dobře upěchujeme, aby nezůstávaly bublinky a mezery. Nadbytek pasty odstraníme leštěním povrchu voskovaným papírem. Elektrodu aktivujeme enzymem tak, že na hladký povrch kápneme ca 5 μl aktivní enzymové frakce získané afinitní chromatografií a opatrně vložíme do malé Petriho misky, v níž je malý smotek vaty namočený v 25% glutaraldehydu. Uložíme do chladničky na ca 1 hod., během níž dojde k navázání enzymu na Enzacryl AH vlivem par glutaraldehydu. Operaci je možno opakovat pro zvýšení zachycené aktivity.

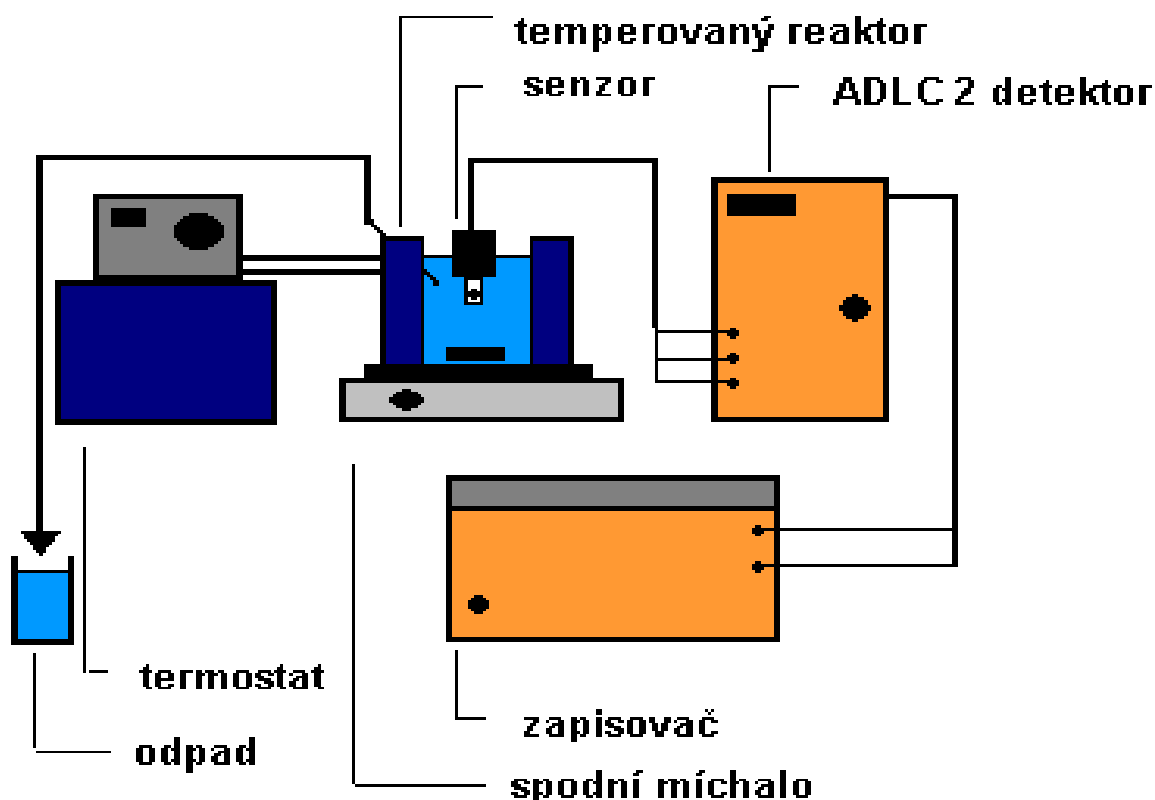
Jinou možností imobilisace enzymu v uhlíkové pastě je jeho vmísení do celého objemu pasty. Vyžaduje však větší množství enzymu a je vhodné jen pro seriová měření, kdy se povrch musí často obměňovat.

Schema elektrody je na následujícím obrázku. Membrána prodlužuje životnost elektrody, ale snižuje odezvu a pro krátkodobá měření jako je naše ji vynecháme.



Měření

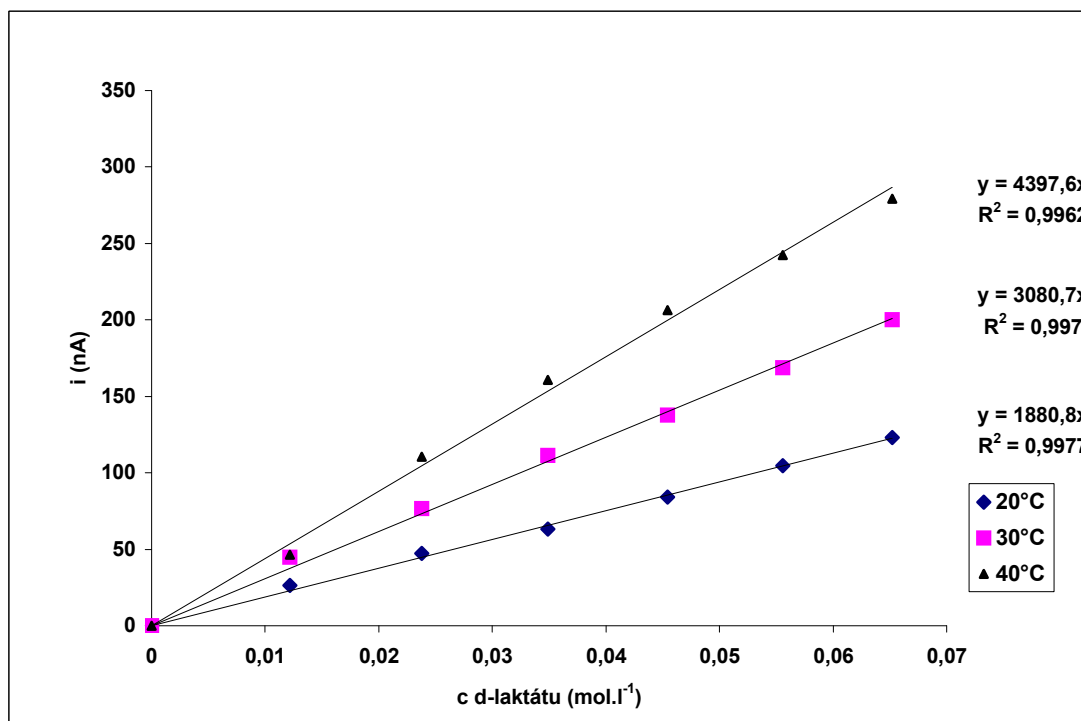
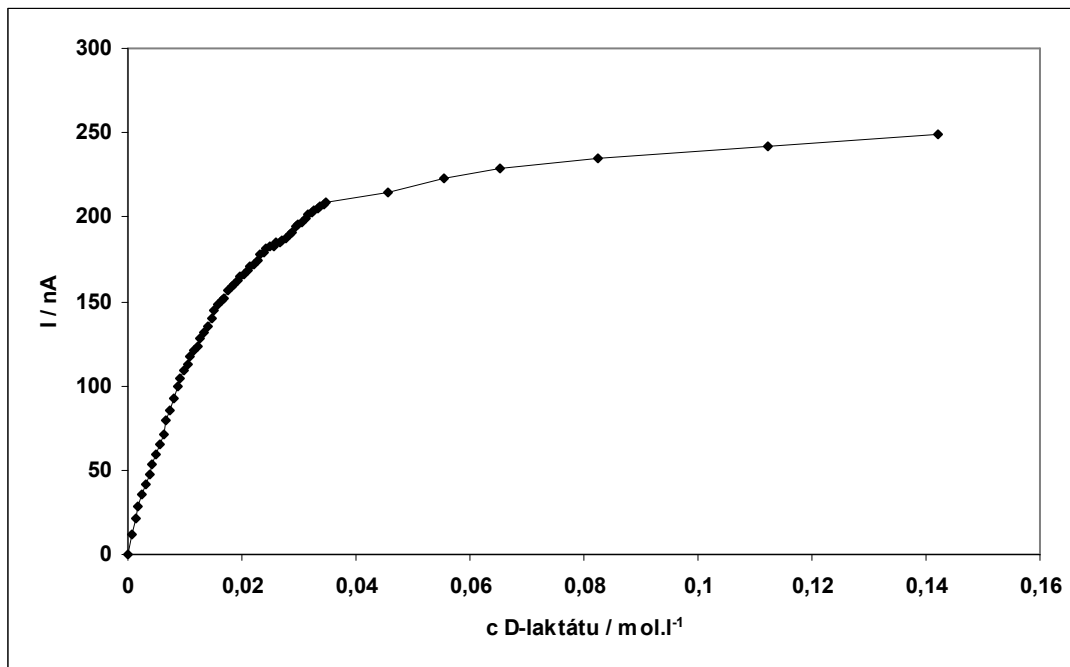
provedeme v termostatované reakční nádobce o objemu 6 ml na elektromagnetické míchače v tříelektrodovém uspořádání. Proud měříme amperometrickým detektorem ADLC 2 s výstupem na zapisovač. Míchání zajišťuje spodní magnetické míchadlo o průměru otáčení 5mm. Schema zapojení je na následujícím obrázku - senzor představuje pracovní elektrodu, jako referentní je použita kalomelová elektroda a pomocnou elektrodou je platinová elektroda. Šum je minimalisován přístrojovým RC filtrem 4 s. Citlivost měření se zvyšuje s teplotou až do 40 °C, proto měření provádíme za teploty na 30-40 °C.



Zapneme přístroj a termostát, potenciál ADC2 nastavíme na 0. Do reakční nádobky napipetujeme 4,0ml 10 mM fosfátového pufru pH 7,0 s 60 mM NaCl (tento roztok je předem vytemperován na teplotu měření), spustíme zapisovač a po ustálení základní linie napipetujeme vzorek. Vyčkáme, až se záznam ustálí a odečteme hodnotu proudu i (nA).

Kalibraci provedeme malými přídávky 1M roztoku substrátu tak, abychom pokryli rozsah výsledných koncentrací 0-50 mM D-laktátu. Vyneseme naměřené hodnoty proudu i proti koncentracím D-laktátu a získáme kalibrační závislost, jejíž vzor je na následujících obrázcích. Ty byly získány užitím roztoku čistého D-laktátu, jenž však pro vysokou cenu

nemůže být standartně používán a je nahrazen roztokem D,L-laktátu (bylo ověřeno, že přítomnost L-enantiomeru neruší a pro výpočet koncentrací D-laktátu lze užít poloviční hodnoty celkové koncentrace).



Nakonec provedeme měření s přidavkem vzorku o neznámé koncentraci D-laktátu (modelový vzorek, kde koncentraci zná vedoucí cvičení a praktický vzorek - např. pivo či mléčný výrobek). Odečteme i a z kalibrační závislosti určíme koncentraci D-laktátu v neznámém vzorku.