

БІОХІМІЯ

УДК 543.94+577.152.1

**ВИКОРИСТАННЯ ФЛАВОЦИТОХРОМУ b_2 , ІММОБІЛІЗОВАНОГО
НА МАГНІТНИХ МІКРОЧАСТИНКАХ, У БАГАТОКРАТНОМУ
ЕНЗИМАТИЧНОМУ АНАЛІЗІ L-ЛАКТАТУ**

М. Карковська^{1*}, О. Смуток¹, М. Гончар^{1,2}

*¹Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна*

*²Інститут прикладної біотехнології та фундаментальних наук,
Жешувський університет
вул. Соколовська, 26, Колбушова, Польща
e-mail: mariakarkovska@gmail.com*

Розробка селективних, чутливих і водночас недорогих методів аналізу важливих з практичної точки зору аналітів – біомаркерів найбільш поширених захворювань та індикаторів якості фармацевтичних препаратів і харчових продуктів є актуальною проблемою сьогодення. Серед таких біомаркерів важлива роль належить L-лактату – універсальному метаболіту більшості живих організмів. Раніше нами було розроблено високоселективний та недорогий ензиматично-фотометричний метод визначення L-лактату на основі L-лактат : цитохром с-оксидоредуктази (КФ 1.1.2.3; флавоцитохрому b_2 ; ФЦ b_2) з формуванням кольорового продукту – розчинної форми Берлінської блакиті за наявності специфічного розчинника. Перевагами запропонованого методу/набору є абсолютна селективність, простота процедури аналізу та низька ціна порівняно з аналогічними комерційними наборами. Метою цієї роботи було дослідити можливість повторного використання флавоцитохрому b_2 , іммобілізованого на магнітних мікрочастинках, для ензиматичного визначення вмісту L-лактату, не знижуючи точності визначення. Доведено, що біофункціоналізовані ферментом магнітні мікрочастинки можуть бути використані для проведення багаторазового (принаймні шестиразового) ензиматичного аналізу L-лактату.

Ключові слова: магнітні мікрочастинки, флавоцитохром b_2 , L-лактат, ензиматичний набір.

Актуальність запланованих досліджень пов'язана з потребою у розробці селективних, чутливих, і водночас недорогих методів аналізу практично важливих аналітів – біомаркерів найбільш поширених захворювань та індикаторів якості фармацевтичних препаратів і харчових продуктів. Серед таких біомаркерів важлива роль належить метаболітам, зокрема, L-лактату. У клінічній діагностиці L-лактат служить біомаркером при діагностиці гіпоксії [1], молочнокислого ацидозу [4], деяких гострих серцевих захворювань [5], а також ефекту Варбурга для виявлення злоякісних пухлин [6]. Причинами зміни концентрації лактату також можуть бути цукровий діабет або патологічне всмоктування жирних кислот у товстому кишківнику [7]. У спортивній медицині за рівнем L-лактату здійснюється оцінка ефективності тренувальних режимів і тренажерного обладнання [8]. У харчовій промисловості L-лактат відіграє неоднозначну роль. Він слугує ключовим компонентом, який впливає на смак, рН і емульгаційну стабільність харчових продуктів [9]. З іншого боку, висока концентрація молочної кислоти в деяких продуктах може бути ознакою їхнього псування і бактерійного забруднення [10]. Раннє визначення лактату в їжі може бути використане для забезпечення належного рівня якості продуктів, зниження ризику харчових отруєнь і

фінансових втрат через відкликання неякісних продуктів [11]. З огляду на важливість, розробка нових і вдосконалення наявних ензиматичних та біосенсорних підходів визначення молочної кислоти в біологічних зразках є надзвичайно актуальною проблемою.

В останні роки особливий інтерес викликає використання нано- та мікророзмірних матеріалів, особливо у поєднанні з біоселективними елементами – ферментами, для розробки технологій одержання біонаноматеріалів із каталітичними властивостями. Це зумовлюється тим, що однією з основних особливостей нано- та мікророзмірних матеріалів є висока хімічна активність, що обумовлена їхньою підвищеною здатністю до іонно-го чи атомного обміну, адсорбції на різноманітних поверхнях, до утворення поверхневих зв'язків із іншими адсорбуючими частинками та ін. Відомо, що найважливішою перевагою мікрочастинок є їхній розмір, а також пов'язані з цим специфічні властивості: велика площа поверхні, можливість перенесення молекул у тканини чи клітини для захисту їх від біодеградації та вивільнення впродовж тривалого часу, локальність дії та специфічність взаємодії з біологічними молекулами [12]. Це дає змогу створювати біочастинки (імобілізованих ферментів на поверхні мікрочастинок) із подальшим їхнім використанням в ензиматичних реакціях.

Метою нашої роботи є дослідження можливості використання біофункціоналізованих флавоцитохром b_2 (ФЦ b_2) магнітних мікрочастинок для покращення ензиматичного набору для визначення L-лактату.

Матеріали та методи

У роботі використовували генетично модифікований штам метилотрофних дріжджів *Ogatea (Hansenula) polymorpha* “tr 1” (*gcr1*, *catX*, *CYB2*) – надпродуцент флавоцитохрому b_2 із колекції Інституту біології клітини НАН України [13].

Дріжджі вирощували в синтетичному середовищі Берггольдера – СБ [14] такого складу: KH_2PO_4 – (0,5–1) г·л⁻¹; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – (2–3,5) г·л⁻¹; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – (0,2–0,5) г·л⁻¹; CaCl_2 – 0,1 г·л⁻¹; сіль Мора – (0,2 мг–1) мг·л⁻¹. До СБ додавали дріжджовий екстракт у кінцевій концентрації 0,75%. Вихідні штами зберігали на скосах зі суло-агаром. Дріжджі вирощували в колбах Ерленмейера на роторному шейкері при 250 об·хв⁻¹ або на чашках з 2% агаризованим середовищем у термостаті при температурі 30°C. Клітини осаджували за 3000 об·хв⁻¹ упродовж 10 хв, відмивали 50 мМ калій-натрій фосфатним буфером, рН 7,8 (ФБ). Оптичну густину суспензії клітин вимірювали турбідиметрично на фотоелектроколориметрі КФК-2МП (кювета 3 мм, світлофільтр № 6), і, використовуючи калібрувальну криву, визначали їхню суху біомасу в 1 мл середовища. Для отримання безклітинного екстракту (БЕ) відмиті від середовища клітини руйнували на планетарному гомогенізаторі (діаметр скляних кульок 0,5 мм, 1000 об·хв⁻¹, r_{cep} 10 см, 6 хв, 4°C). Осади промивали 50 мМ ФБ, рН 7,8 із 1 мМ ЕДТА й 1 мМ ФМСФ і повторно руйнували та центрифугували. БЕ відділяли від уламків клітин центрифугуванням при 15 000 g, r_{cep} 8 см, 15 хв, 4°C. В БЕ визначали активність цільового ферменту [15] і концентрацію білка за методом Лоурі [16].

За основу препаративного очищення флавоцитохрому b_2 (ФЦ b_2) зі штаму *Hansenula polymorpha* “tr 1” було використано схему очищення ФЦ b_2 , розроблену для дріжджів *Hansenula anomala* [17]. Оптимізована схема виділення й очищення ФЦ b_2 складалася з таких етапів:

Лізис клітин. Висушені клітини (2 г) лізували за наявності 1,2 мл бутанолу при кімнатній температурі з додаванням 100 мл буферу А: 0,1 М лактат натрію у 20 мМ ФБ, рН 7,5; 0,025 мМ ЕДТА; 1 мМ ФМСФ. Суміш витримували 12 год при 4°C.

Отримання безклітинних екстрактів. Відстояну суміш центрифугували 30 хв при 0°C 4000 об·хв⁻¹ на центрифугі К 23, супернатант відбирали, осад повторно екстрагували.

Йонообмінна хроматографія на ДЕАЕ-целюлозі. БЕ наносили на колонку (1,0 x 20 см). Як сорбент використовували ДЕАЕ–целюлозу Toyopearl 650 M (1-7-7, AKASAKA TOKYO, Японія), зрівноважену буфером А. Колонку промивали буфером А (70 мл), пізніше 50 мл буфера Б, який містив буфер А з 0,1 М натрій-калій-фосфатом, рН 7,6. Для елюції використовували 15% (від насичення при 0°C) сульфат амонію в буфері Б. Ступінь очищення цільового ферменту від баластних білків характеризували двома способами, визначаючи його активність у фракціях елюатів і за допомогою електрофорезу в ПААГ за денатуруючих умов (за наявності SDS).

Висолювання ферменту проводили додаванням до елюату сухого сульфату амонію до 70% (від насичення при 0°C при контролі рН близько 7,0–7,5). Стабілізований у такий спосіб фермент зберігав свою активність протягом двох місяців при – 25°C.

Статистичний аналіз експериментальних даних

Досліди проводились у чотирьох-шести повторах. Для кожної вибірки показників визначали середнє значення (М), стандартну похибку середнього (m). Розрахунок статистичних показників і побудову графіків проводили за допомогою програми OriginLab 7,0. Вказані параметри та статистичні показники наведені в рисунках і таблицях.

Результати і їхнє обговорення

Наноструктуровані матеріали часто характеризуються унікальними електричними, хімічними, структурними та магнітними властивостями, що дає змогу використовувати їх у різних нових галузях: у зберіганні інформації, як біодатчики й у біомедицинній інженерії. Наночастинки, яким притаманні магнітні властивості, мають особливі переваги, оскільки можуть забезпечити селективне приєднання до біологічних молекул із наданням їм магнітних властивостей, що дає змогу розділити ці речовини (рис. 1) або адресно транспортувати у певні тканини тіла під дією магнітного поля.

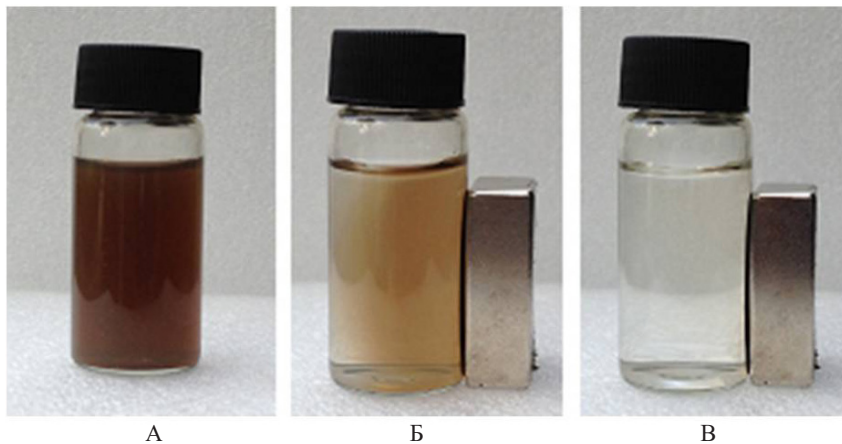


Рис. 1. Зображення осадження магнітних мікрочастинок у магнітному полі: А – магнітні мікрочастинки; Б – процес відділення магнітних частинок від суміші, що їх містить, під дією прикладеного магніту; В – відділенні магнітні частинки від суміші, що їх містить, унаслідок дії прикладеного магніту.

Для з'ясування можливості повторного використання ФЦ b_2 при проведенні кількісного визначення L-лактату за допомогою розроблених раніше методів було проведено іммобілізацію ферменту на поверхні функціоналізованих комерційних мікрочастинок на основі оксиду заліза, вкритих силаном «BioMag® Plus particles», розміром 1 мкм, функ-

ціоналізованих аміногрупами ("Micro particles, magnetic, amino functionalized, Sigma-Aldrich"). Така іммобілізація була можливою завдяки електростатичним взаємодіям протонованої аміногрупи мікроносія та зарядженого за рН 7,8 білка.

Розчин магнітних мікрочастинок (Fe-МЧ) концентрацією 50 мг·мл⁻¹ при рН 7,0 розводили до кінцевої концентрації 1,5 мг·мл⁻¹ та вносили рівний об'єм очищеного препарату ферменту з активністю 3,75 Од·мл⁻¹ та концентрацією білка 1,5 мг·мл⁻¹. Отриману суспензію загальним об'ємом 400 мкл інкубували протягом 1,5 год при +8°C для іммобілізації ферменту на магнітному носії. Після інкубації біофункціоналізовані магнітні мікрочастинок осаджували у магнітному полі та двічі промивали 5,0 мМ фосфатним буфером рН 7,5. Ефективність зв'язування ФЦ b_2 на комерційних феромагнітних мікрочастинках оцінювали за активністю ферменту (за температури 30°C) на різних стадіях іммобілізації (табл. 1).

Активність ФЦ b_2 на різних етапах іммобілізації на поверхні комерційних феромагнітних мікрочастинок (Fe-МЧ)

Показник	Розчин ферменту до іммобілізації	Промивні розчини		Супернатант після іммобілізації	Іммобілізований фермент на Fe-МЧ
		I	II		
Об'єм, мл	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Концентрація білка, мг·мл ⁻¹	1,5±0,04	0,05±0,01	0,07±0,01	0,77±0,06	0,6±0,01
Активність, Од·мл ⁻¹	11,25±0,06	—*	—*	1,74±0,04	19,5±0,30
Сумарна активність, Од.	4,5	—	—	0,67	7,8
Вихід, %	=100	0	0	15	173

Примітка: * поза межею визначення.

Згідно з даними таблиці, близько 85% ферменту зв'язується з Fe-МЧ (100% - 15%). Важливо зазначити, що у процесі іммобілізації зростає активність ферменту в 1,73 разу, що, ймовірно, спричинюється відокремленням компонентів грубого препарату ФЦ b_2 , які гальмують активність ферменту.

Біофункціоналізовані мікрочастинок (ФЦ b_2 -МЧ) характеризували за спектрами поглинання (рис. 2).

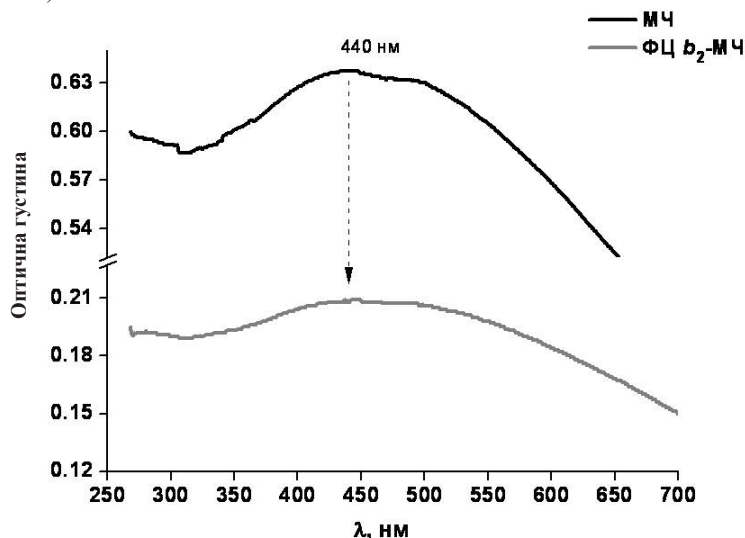


Рис. 2. Спектральні характеристики немодифікованих магнітних (МЧ) та біофункціоналізованих мікрочастинок (ФЦ b_2 -МЧ) із кінцевою концентрацією 30 мкг·мл⁻¹.

У спектрі поглинання МЧ спостерігається чіткий пік при 440 нм, характерний для іонів Fe^{2+} [18]. Після процесу біофункціоналізації спостерігається розмитий пік, що, можливо, пов'язано з ефектом розведення МЧ у процесі іммобілізації ФЦ b_2 .

Препарат ФЦ b_2 -МЧ із активністю 6,5 Од·мл⁻¹ було використано для з'ясування можливості повторного використання ферменту в ензиматичній реакції визначення L-лактату. Розроблений нами раніше ензиматичний метод для кількісного визначення L-лактату [2, 3] ґрунтується на формуванні розчиненої форми Берлінської блакиті внаслідок ензиматичної та хімічної реакцій (рис. 3).

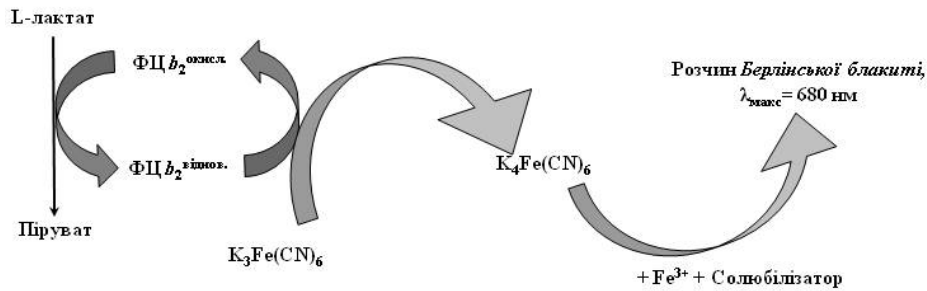


Рис. 3. Схематичне зображення принципу визначення L-лактату ензиматичним набором «Лактатест».

Для повторного використання ФЦ b_2 -МЧ їх відокремлювали від реакційної суміші в магнітному полі, а до залишку реакційної суміші вносили реагенти, які забезпечують формування барвника та його розчинність. Відібрані ФЦ b_2 -МЧ повторно вносили в реакційну суміш для проведення ензиматичної реакції в наступній серії аналізу. Залежність оптичної густини реакційної суміші з різною концентрацією L-лактату від повторного використання ФЦ b_2 -МЧ як каталізатора у складі ензиматичного набору «Лактатест» представлено на рис. 4.

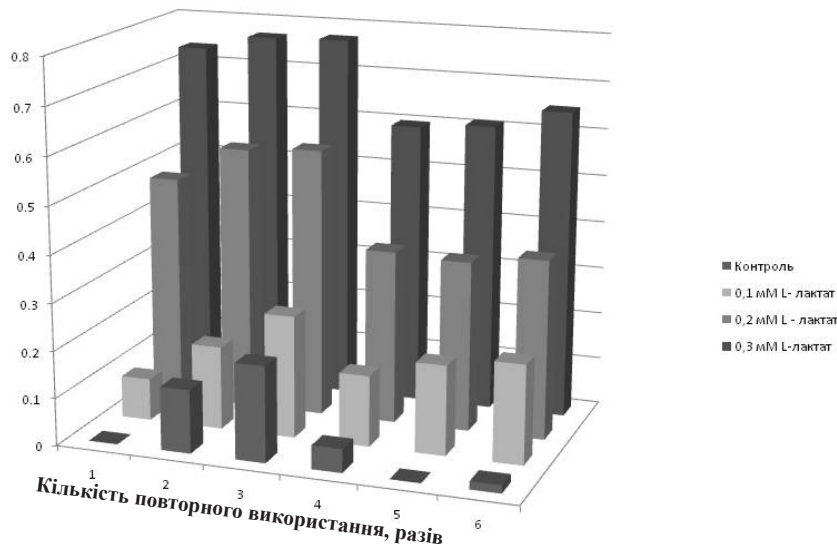


Рис. 4. Залежність оптичної густини реакційної суміші при визначенні L-лактату ензиматичним набором «Лактатест» при повторному використанні ФЦ b_2 -МЧ. Вимірювання проводили проти проби із ФЦ b_2 -МЧ без додавання L-лактату. **Примітка:** m – похибка середнього арифметичного повтору; кількість даних $n=4$; 1 повтор $m=0,17$; 2 повтор $m=0,15$; 3 повтор $m=0,13$; 4 повтор $m=0,12$; 5 повтор $m=0,13$; 6 повтор $m=0,19$.

Протестовано різні концентрації L-лактату, які перебувають у діапазоні лінійності набору. Як видно із рис. 4, зміна оптичної густини реакційної суміші при шестиразовому повторному використанні ФЦ b_2 -МЧ знижується незначно. Таким чином, ФЦ b_2 -МЧ можна повторно використовувати для визначення L-лактату, принаймні шестикратно із повторним recalібруванням. Отримані результати підтверджують можливість використання комерційних магнітних мікрочастинок як носія ФЦ b_2 для формування ензиматичних наборів із багатократним використанням ферменту.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Патент України 45283. Спосіб кількісного визначення вмісту L-лактату у продуктах харчування та біологічних рідинах / Гончар М. В., Смуток О. В., Осьмак Г. С. (Україна); Опубл. 10.11.2009, Бюл. № 21.
2. Черноусова С., Енгле М. Наночастинки в медицині // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнології: зб. наук. пр. К. : РВВ ІМФ, 2012. Т. 10. № 3. С. 667–685.
3. Шавловский Г. М., Жарова В. П., Щелокова И. Ф. и др. Флавиногенная активность природных штаммов дрожжей *Pichia guilliermondi* // Прикл. биохимия и микробиология. 1978. Т. 14. С. 184–189.
4. Patent PCT/US2008/069637 США. Flavocytochrome b_2 -based enzymatic composition, method and kit for L-lactate / Gonchar M., Smutok O., Os'mak H. (США); International publication WO/2009/009656, International PCT Patent Application (No PCT/US2008/069637), publ. <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2009009656>;
5. Ackland M. R., Reeder J. E. A rapid chemical spot test for the detection of lactic acid as an indicator of microbial spoilage in preserved foods // Appl. Bacteriol. 1984. Vol. 56. P. 415.
6. Appleby C. A, Morton R. K. Lactic dehydrogenase and cytochrome b_2 from yeast. Purification and crystallization // Biochem. J. 1959. Vol. 71. P. 492–499.
7. Beneke R., Leithäuser R. M., Ochentel O. Blood lactate diagnostics in exercise testing and training // International journal of sports physiology and performance. 2011. Vol. 6. N 1. P. 8–24.
8. Bleiberg B., Steinberg J., Katz S. et al. Determination of plasma lactic acid concentration and specific activity using high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. 1991. Vol. 568. N 2. P. 301–308.
9. Celerier J., Risler Y., Schwencke J. Isolation of the flavodehydrogenase domain of *Hansenula anomala* flavocytochrome b_2 after mild proteolysis by an *H. anomala* proteinase // Eur. J. Biochem. 1989. Vol. 182. N 1. P. 67–75.
10. Dmitruk K. V., Smutok O. V., Gonchar M. V., Sibirnyĭ A. A. Construction of flavocytochrome b_2 -overproducing strains of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) // Microbiology (Moscow). 2008. Vol. 77. N 2. P. 213–218.
11. Holzmann M., Cnattingius S., Nordström L. Lactate production as a response to intrapartum hypoxia in the growth-restricted fetus // An International Journal of Obstetrics and Gynaecology. 2012. Vol. 119. P. 1265–1269.
12. Ichai C., Leverve X., Orban J.-Ch. Lactate and Acute Heart Failure Syndrome / in the Book Acute Heart Failure (Springer publishing ISBN: 978-1-84628-781-7). P. 768–780.
13. Koppenol W., Bounds L., Dang C. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism // Nature Reviews Cancer. 2011. Vol. 11. P. 325–337.
14. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.

15. *Martin M. F. Choi.* Application of a long shelf-life biosensor for the analysis of L-lactate in dairy products and serum samples // *Food Chem.* 2005. Vol. 92. P. 575–581.
16. *Palmisano F., Quinto M., Rizzi R., Zambonin P.* Flow injection analysis of L-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detection at a disposable biosensor // *Analyst.* 2001. Vol. 126. P. 866–870.
17. *Watkins P. J., Smith J. S., Fitzgerald M. G., Malins J. M.* Lactic Acidosis in Diabetes // *Br. Med. J.* 1969. Vol. 22. P.744–747. PMID: PMC1982811.
18. *Zhang X., Niu Y., Meng X., Li Y., Zhao J.* Structural evolution and characteristics of the phase transformations between α -Fe₂O₃, Fe₃O₄ and γ -Fe₂O₃ nanoparticles under reducing and oxidizing atmospheres // *CrystEngComm.* 2013. Vol. 15. P. 8166–8172.

Стаття: надійшла до редакції 28.01.16

доопрацьована 15.03.16

прийнята до друку 11.04.16

USAGE OF FLAVOCYTOCHROME *b*₂ IMMOBILIZED ONTO MAGNETIC MICROPARTICLES IN MULTIPLE ENZYMATIC ANALYSIS OF L-LACTATE

M. Karkovska¹, O. Smutok¹, M. Gonchar^{1,2}

¹*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

²*Institute of Applied Biotechnology and Basic Sciences, Rzeszow University
26, Sokolowska St., Kolbuszowa, Poland
e-mail: mariakarkovska@gmail.com*

Development of selective, sensitive and simultaneously, inexpensive methods for analysis of practically important analytes - biomarkers of diseases and indicators of pharmaceuticals and food quality is an actual problem nowadays. Among of these biomarkers L-lactate plays an important role as an universal metabolite of almost all living organisms. Previously we have developed a highly selective and inexpensive enzymatic photometric method for L-lactate assay based on L-lactate : cytochrome c-oxidoreductase (EC 1.1.2.3; flavocytochrome *b*₂; FC *b*₂) and formation of colored product – the soluble form of Berlin blue at the presence of specific solubilizer. The advantages of the proposed L-lactate selective method/kit are absolute selectivity, simple procedure of analysis and inexpensively in compare with analogues commercial kits. The aim of this study was to investigate the reusability of flavocytochrome *b*₂ immobilized on the magnetic microparticles for enzymatic analysis of L-lactate, without compromising the accuracy of the analysis. It was revealed that bio-functionalized magnetic microparticles can be reused for multiple (at least six times) enzymatic analysis of L-lactate using proposed L-lactate selective kit.

Keywords: magnetic microparticles, flavocytochrome *b*₂, L-lactate, enzymatic kit.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЛАВОЦИТОХРОМА b_2 , ИММОБИЛИЗОВАННОГО НА МАГНИТНЫХ МИКРОЧАСТИЦАХ, В МНОГОКРАТНОМ ЭНЗИМАТИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ L-ЛАКТАТА**М. Карковская¹, А. Смуток¹, М. Гончар^{1,2}**¹*Институт биологии клетки НАН Украины
ул. Драгоманова, 14/16, Львов 79005, Украина*²*Институт прикладной биотехнологии и фундаментальных наук,
Жешувский университет
ул. Соколовска, 26, Колбушова, Польша
e-mail: mariakarkovska@gmail.com*

Создание селективных, чувствительных и одновременно недорогих методов анализа важных с практической точки зрения аналитов – биомаркеров наиболее распространённых заболеваний и индикаторов качества фармацевтических препаратов и пищевых продуктов является актуальной проблемой сегодняшнего дня. Среди таких биомаркеров важная роль принадлежит L-лактату – универсальному метаболиту почти всех живых организмов. Ранее нами был разработан высокоселективный и недорогой энзиматически-фотометрический метод определения L-лактата на основе L-лактат : цитохром с-оксидоредуктазы (КФ 1.1.2.3; флавоцитохрома b_2 ; ФЦ b_2) с формированием цветного продукта – растворимой формы Берлинской лазури при наличии специфического растворителя. Преимуществом описанного метода/набора определения L-лактата являются абсолютная селективность, простота процедуры проведения анализа и небольшая цена, в сравнении с аналогичными коммерческими наборами. Целью данной работы было исследовать возможность повторного использования флавоцитохрома b_2 , иммобилизованного на магнитных микрочастицах, при энзиматическом определении содержания L-лактата, не снижая точности анализа. Доказано, что биофункционализованные ферментом магнитные микрочастицы могут быть использованы для проведения многократного (по крайней мере шестикратного) энзиматического анализа L-лактата.

Ключевые слова: магнитные микрочастицы, флавоцитохром b_2 , L-лактат, энзиматический набор.