

РОЗРОБЛЕННЯ АМПЕРОМЕТРИЧНОГО МІКРОБІОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ D-СЕРИНУ

О. О. Солдаткін

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

E-mail: alex_sold@yahoo.com

Створено лабораторний прототип мікробіосенсора для визначення концентрацій D-серину. Чутливим елементом біосенсора слугує біоселективна мембрана на основі оксидази D-амінокислот, іммобілізованої з БСА на поверхні амперометричного мікроперетворювача. При оптимізації роботи мікробіосенсора вивчено залежність його відгуків від концентрації буфера та температури. Показано, що мікробіосенсор є стабільним, його відгуки відтворювані, а діапазон лінійності визначення субстрату знаходиться в діапазоні концентрацій D-серину 0–0,8 мМ з мінімальною межею визначення 2 мкМ. Розроблений амперометричний мікробіосенсор можна успішно використовувати для подальших експериментів з оптимізації та адаптації його роботи при визначенні концентрації рівня D-серину в різноманітних біологічних рідинах як *in vitro*, так й *in vivo*.

Ключові слова: D-серин, оксидаза D-амінокислот, амперометричний перетворювач, мікробіосенсор, аналіз *in vitro* та *in vivo*.

D-серин — відомий нейромедіатор, синтезується в гліальних клітинах [1] і нейронах [2, 3] через рацемізацію L-серину сериною рацемазою [1]. Він вивільняється з астроцитів у відповідь на хімічну стимуляцію глутаматом або антагоністами глутаматових рецепторів [4,5]. D-серин відіграє важливу роль у пластичності синапсів [6] та в деяких неврологічних і психіатричних розладах, таких як шизофренія [7, 8], ішемія [9], хвороба Альцгеймера [10] та аміотрофічний латеральний склероз [11]. Зокрема, концентрація D-серину зменшується в цереброспінальній рідині шизофреніків [12, 13], і його введення збільшує терапевтичний ефект відомих антипсихотичних ліків [14, 15]. Незважаючи на фізіологічну важливість D-серину в цих хворобах, зміни його концентрацій в центральній нервовій системі (ЦНС) під час патологічних станів залишаються значною мірою не з'ясованими. Біохімічні та клітинні механізми, що контролюють міжклітинну концентрацію D-серину в мозку, також остаточно не досліджено. Для вирішення цих вагомих питань украй важливе значення має розвиток швидких і селективних методів аналізу для моніторингу динаміки змін концентрацій D-серину в мозку.

Для вимірювання вільного D-серину в ЦНС застосовують мікродіаліз [16–18]. Незважаючи на його значну аналітичну силу, мікродіаліз обмежений великим розміром

зондів для забору зразків мозку і повільною дифузією молекул крізь діалізну мембрану. Зокрема, імплантація мікродіалізних зондів у ЦНС часто спричинює ушкодження, що погіршують фізіологічні процеси навколо зонда [19–21]. Більш того, мікродіалізні зонди занадто великі для аналізів усередині зрізів мозку чи в маленьких структурах ЦНС щурів або мишей.

Для усунення цих технічних обмежень ми розробили ензимний мікробіосенсор, здатний визначати D-серин *in vitro* та *in vivo* в низькому мікромольному діапазоні (фізіологічні концентрації).

Матеріали і методи

Рекомбінантну оксидазу D-амінокислот (КФ 1.4.3.3) із *Rhodotorula gracilis*, суперекспресовану в *E. coli* й очищену за методикою, описаною в роботі [22], з активністю 55 од. акт. мг⁻¹, було люб'язно надано професором Л. Поллегіоні. D-серин, бичачий сироватковий альбумін (БСА), 50% -й водний розчин глутарового альдегіду, 3% -й водний розчин пероксиду водню, *m*-діамінобензол (*m*-ДАБ), НЕРЕС, гомованілінова, аскорбінова, аспарканова, сечова кислоти, цистеїн, допамін, ацетамінофен та інші речовини — виробництва Sigma–Aldrich Chimie.

Мікроелектроди на основі платинового дроту (D = 25 мкм) виготовлено в нашій ла-

бораторії (рис. 1). Скляний капіляр з відтягнутим кінцем обрізали таким чином, щоб отримати тупий зріз із внутрішнім діаметром близько 35 мкм, в який вставляли платиновий дріт діаметром 25 мкм завдовжки 8–10 мм. З'єднання капіляра з платиновим дротом герметизували епоксидною смолою. Після з'єднання кінець платинового дроту обрізали до необхідної довжини за допомогою скальпеля під мікроскопом. Якісний електричний контакт між платиновим та мідним провідником забезпечувався через затискний контакт. Інший край мідного дроту виконував роль контактної зони для приєднання до потенціостату PalmSens.

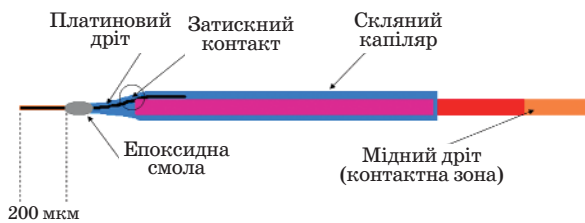


Рис. 1. Конструкція амперометричного мікроелектрода на основі платинового дроту

Методика модифікації платинових мікроелектродів

Наступним кроком було нанесення шару полімеру на основі *m*-ДАБ з розчину з концентрацією мономера *m*-ДАБ 0,1 М у 10 мМ фосфатному буфері (рН 7,0). Перед використанням розчин *m*-ДАБ знекиснювали 15-хвилинним продуванням аргонном. Електрохімічне осадження плівки на поверхні платинового дроту здійснювали впродовж 45 хв за постійного потенціалу (+0,7 В). Перед виготовленням біоселективної мембрани модифіковану поверхню ретельно промивали дистильованою водою.

Виготовлення біоселективних мембран

Біоселективні ензимні мембрани виготовляли, застосовуючи суміш ензиму з БСА, отриману в 0,02 М фосфатному буфері, рН 7,5. Кінцева концентрація ензиму становила 58 мг/мл, а БСА — 25 мг/мл. До кожної суміші додавали також гліцерол 1% (w/w), щоб стабілізувати ензими впродовж їх іммобілізації, запобігти передчасному висиханню та поліпшити адгезію мембрани до поверхні перетворювача. Розчин глутарового альдегіду (ГА) з кінцевою концентрацією 0,2% (w/w) застосовували для перехресного зв'язування молекул ензиму та БСА. Суміш, що містила ензим, БСА, гліцерол та ГА, на-

носили на чутливу поверхню перетворювача, після чого витримували 1 год за кімнатної температури.

Методика вимірювання

Виміри проводили у 25 мМ HEPES-буфері, рН=7,4, при температурі 24 °С та 36 °С у відкритій комірці за інтенсивного перемішування. Концентрацію субстрату в комірці задавали внесенням до робочого буфера порцій стандартних концентрованих вихідних розчинів D-серину. Спочатку отримували базову лінію біосенсора за відсутності субстрату (D-серину). Після внесення субстрату в розчин максимальних величин відгуків досягали за 2 хв. Біосенсорне визначення субстрату можна оцінювати за двома показниками: швидкістю накопичення пероксиду водню, що продукується під час ензиматичної реакції, або за стаціонарною величиною максимального відгуку біосенсора, коли в системі встановлюється рівновага. Динамічний діапазон визначення D-серину в обох випадках практично однаковий. Тому в подальших експериментах було вирішено використовувати максимальну величину відгуку як реакцію біосенсора на внесення субстрату. Час аналізу становив 2 хв. Усі дослідження проводили щонайменше у трьох серіях.

Результати та обговорення

Поряд із численними перевагами амперометричних біосенсорів, на жаль, трапляються й недоліки. Наприклад, значна кількість їх характеризується недостатньою селективністю. В основі селективності біосенсора лежить як селективність самого перетворювача, з одного боку, так і селективність ензиматичної системи, — з другого. У нашому випадку селективність перетворювача — це селективність платинового електрода до визначення пероксиду водню. Платиновий електрод без спеціальної модифікації поверхні не є селективним перетворювачем, оскільки багато електроактивних речовин можуть окиснюватися на ньому, генеруючи електрохімічний сигнал. Тому першим етапом нашої роботи було підвищення селективності використаних в роботі мікроперетворювачів на основі платинового дроту нанесенням на електрод додаткової полімерної мембрани, яка обмежувала б дифузію інтерферуючих речовин до поверхні електрода. Як відомо з-поміж широкого класу оксидних та аміноароматичних речовин, що здатні до електрополімеризації, в біосенсорах

найчастіше використовують ізомери діамінобензолу (ДАБ) [23–28]. Раніше вже було проведено низку порівняльних досліджень щодо властивостей полімерних мембран на основі ДАБ, отриманих з різних мономерів. У результаті виявлено, що найкращою селективністю характеризувались перетворювачі, модифіковані полімерною плівкою на основі метадіамінобензолу [27, 28]. Відповідно цю речовину й було використано як мономер для створення додаткової полімерної мембрани в нашій роботі. Отримані результати з перевірки селективності мікроелектродів на основі платинових дроту до та після нанесення полімерної плівки наведено на рис. 2.

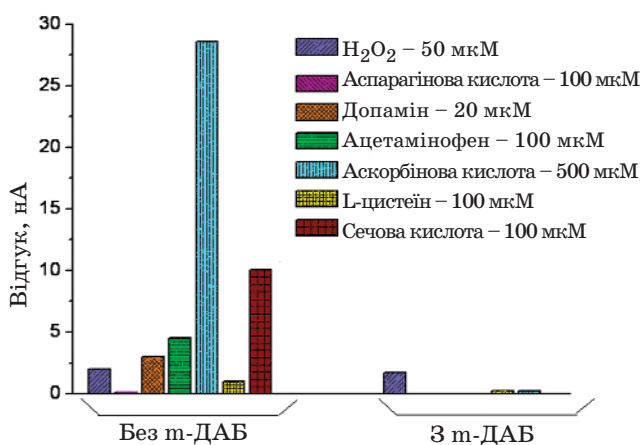


Рис. 2. Порівняння відгуків мікроелектродів на основі платинових дроту (без та з покриттям полімерними мембранами на основі m-ДАБ) до пероксиду водню та ряду електрохімічно активних речовин.

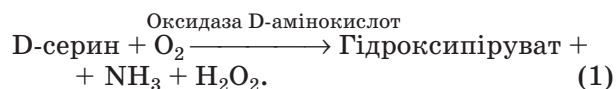
Умови вимірювання: 25 мМ НЕРЕС-буфер (рН 7,4) за постійного потенціалу +0,7 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, температура 36 °С

Як випливає з рис. 2, ми досягли непоганої селективності мікроперетворювача до пероксиду водню відносно можливих електрохімічно активних інтерферентів (аскорбінова, сечова, аспарагінова кислоти, L-цистеїн, ацетамінофен, допамін). Відповідно модифікований мікроперетворювач з таким рівнем селективності вже можна було використовувати для розроблення ензимного біосенсора для вимірів *in vivo*.

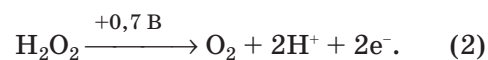
Що стосується селективності самої ензиматичної системи, то відомо, що оксидаза D-амінокислот не є селективним ензимом до будь-якої з D-амінокислот. Але нормальна концентрація D-серину в мозку свавців більш ніж на порядок вища, ніж концентрація другої найпоширенішої D-амінокисло-

ти, — аспарагінової. Концентрації D-аланіну, D-лейцину та D-проліну ще на порядок нижчі. Інші D-амінокислоти взагалі в мозку відсутні [29, 30]. Відповідно, використовуючи мікробіосенсор на основі оксидази D-амінокислот, можна відносно селективно визначати концентрацію D-серину в мозку свавців.

В основі роботи амперометричного мікробіосенсора для визначення D-серину лежить така ензиматична реакція:



Перетворення D-серину супроводжується накопиченням електрохімічно активного пероксиду водню. Потім відбувається електрохімічне окиснення пероксиду водню на поверхні амперометричного електрода:



Це дає можливість визначати D-серин за допомогою амперометричних біосенсорів на основі оксидази D-амінокислот.

Як відомо, робота кожного біосенсора залежить як від його власних характеристик, так і від властивостей розчину, в якому виконують вимірювання. Тому ми вирішили дослідити роботу створеного мікробіосенсора залежно від концентрації буфера (буферної ємності), зі зміною якої змінюється також іонна сила розчину та збільшується його фонові провідність. На рис. 3 наведено результати дослідження залежності величин відгуків розробленого мікробіосенсора на D-серин від концентрації робочого буферного розчину. Аналіз отриманих даних свідчить, що величини відгуків біосенсора на 75 мкМ та 200 мкМ концентрації D-серину практично не змінювались зі збільшенням буферної ємності. Це уможливило використання розробленого нами амперометричного мікробіосенсора для визначення D-серину в біологічних розчинах, що характеризуються різними буферними ємностями та іонною силою.

Як відомо, робота ензимної біоселективної мембрани в складі біосенсора може залежати від температури середовища, в якому здійснюють вимірювання. Крім того, мікробіосенсор для визначення D-серину створювали для роботи *in vivo* ($t = 36 \text{ }^\circ\text{C}$). Тому наступним етапом нашої роботи було дослідити вплив температури на роботу біосенсора на основі оксидази D-амінокислот (рис. 4). Як

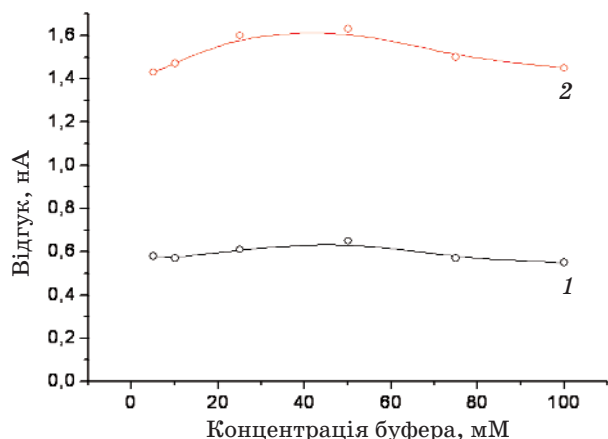


Рис. 3. Залежність величин відгуків мікробіосенсора на основі оксидази D-амінокислот від концентрації робочого буфера (буферної ємності розчину).

Концентрація D-серину — 75 мкМ (1) та 200 мкМ (2). Вимірювання проводили у фосфатному буфері (рН 6,5) за постійного потенціалу +0,7 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння, температура 36 °С

видно з графіка, спочатку зі збільшенням температури до 60 °С чутливість біосенсора зростає в декілька разів, що свідчить про широкий температурний діапазон роботи мікробіосенсора. З подальшим зростанням температури ензим починає денатурувати, відповідно активність біосенсора зменшується. Тому в подальших експериментах під час роботи з реальними біологічними рідинами *in vitro* та екстраполяції даних *in vivo* слід постійно враховувати температуру досліджуваного зразка. Так, зі збільшенням температури від кімнатної (24 °С) до фізіологічної (36 °С) активність мікробіосенсора зростала більш ніж на 50%.

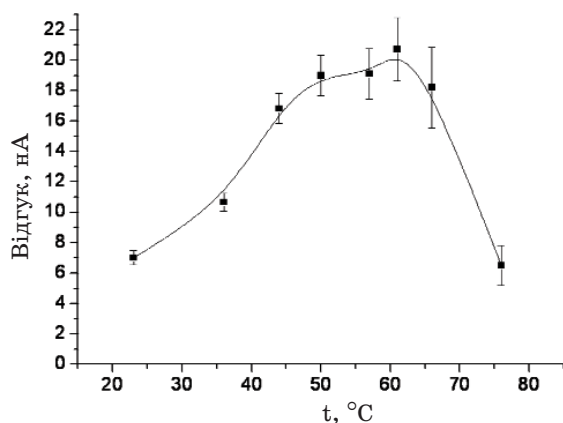


Рис. 4. Залежність величини відгуку мікробіосенсора на основі оксидази D-амінокислот від температури.

Вимірювання проводили у фосфатному буфері (рН 6,5) за постійного потенціалу +0,7 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння. Концентрація D-серину — 1 мМ

Важливими характеристиками біосенсорів є також відтворюваність сигналів та стабільність під час зберігання. Щоб дослідити відтворюваність відгуків розробленого мікробіосенсора, ми впродовж одного робочого дня з інтервалом у 12 хв отримували відгуки біосенсора на дві концентрації D-серину — 25 та 150 мкМ, при цьому сенсор весь час між вимірюваннями залишався у буфері з постійним перемішуванням. Вибрані для досліджень концентрації D-серину знаходилися на лінійному відрізку калібрувальної кривої біосенсора. З рис. 5 видно, що сенсор протягом усього експерименту характеризувався високою стабільністю та відтворюваністю сигналів. Відгуки на 25 мкМ D-серину взагалі майже не змінювались протягом 7 год.

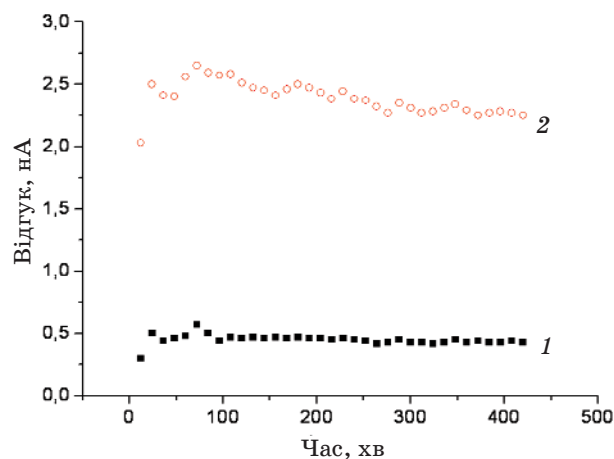


Рис. 5. Відтворюваність сигналів амперометричного мікробіосенсора на основі оксидази D-амінокислот.

Концентрація D-серину — 25 мкМ (1) та 150 мкМ (2). Вимірювання проводили в 25 мМ HEPES-буфері (рН 7,4) за постійного потенціалу +0,7 В відносно Ag/AgCl електроду порівняння, температура 36 °С

Було також проведено серію досліджень з вивчення стабільності розроблених мікробіосенсорів під час зберігання (рис. 6). Біосенсори зберігали в 25 мМ HEPES-буфері (рН 7,4) за температури +4 °С і в сухих умовах при температурах +20 °С та +4 °С. Зразу після створення біосенсорів було отримано їхні відгуки на 75 та 200 мкМ концентрації D-серину в модельному розчині, величини обох відгуків, незалежно один від одного, було прийнято за 100%. Подальші виміри виконували через певні проміжки часу (5–10 днів). Активність біосенсорів, які зберігали в сухих умовах за температури +4 °С спершу дещо зростала, а потім залишалася майже повністю стабільною протягом двох місяців. Водночас мікробіосенсори

для визначення D-серину, що їх зберігали у фосфатному буфері при +4 °С та в сухих умовах при +20 °С, втрачали свою активність повністю. Відповідно, найкращими умовами зберігання розроблених мікробіосенсорів для визначення D-серину було вибрано умови зберігання у сухому стані при температурі +4 °С.

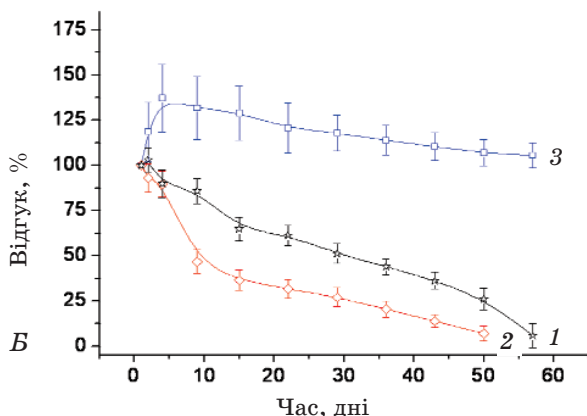
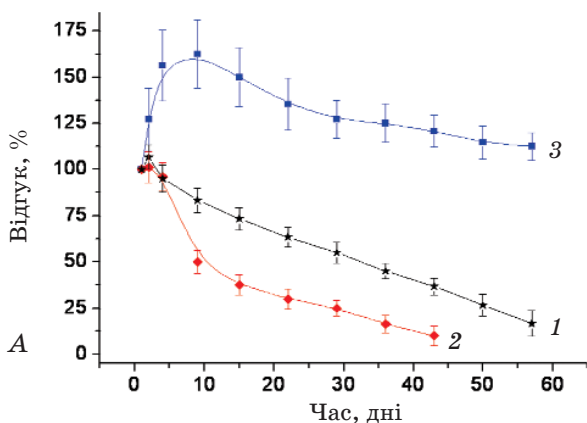


Рис. 6. Залежність величин відгуків мікробіосенсорів, що їх зберігали в буфері +4 °С (1), у сухому стані +20 °С (2), у сухому стані +4 °С (3), від часу зберігання.

Концентрація D-серину — 75 мкМ (А) та 200 мкМ (Б). Умови вимірювання: 25 мМ НЕРЕС-буфер (рН 7,4) за постійного потенціалу +0,7 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, температура 36 °С

Після оптимізації аналітичних характеристик розробленого амперометричного мікробіосенсора та умов його роботи було отримано калібрувальну криву біосенсора для визначення D-серину (рис. 7). Як видно з рисунка, розроблений біосенсор характеризувався широким лінійним діапазоном роботи до 0,8 мМ концентрації D-серину. Мінімальна межа визначення D-серину становила 2 мкМ (концентрація нижча за фізіологічну).

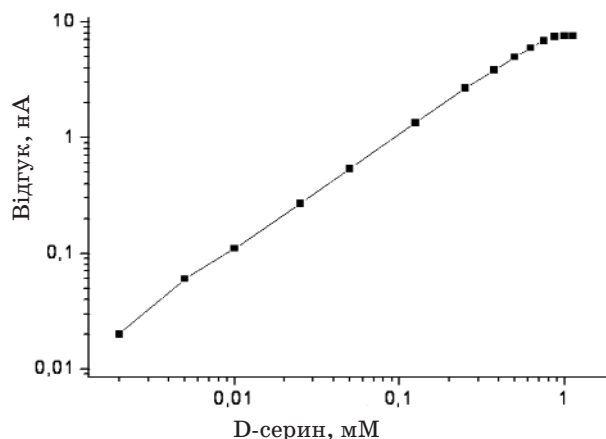


Рис. 7. Калібрувальна крива для визначення концентрації D-серину.

Умови вимірювання: 25 мМ НЕРЕС-буфер (рН 7,4) за постійного потенціалу +0,7 В відносно Ag/AgCl електрода порівняння, температура 36 °С

Таким чином, розроблено амперометричний мікробіосенсор для визначення концентрацій D-серину. Роль чутливого елемента біосенсора відіграє біоселективна мембрана на основі іммобілізованої в БСА матриці оксидази D-амінокислот. При оптимізації роботи мікробіосенсора було вивчено залежність його відгуків від концентрації буфера, іонної сили, температури і досліджено основні аналітичні характеристики (чутливість та селективність до D-серину, відтворюваність сигналу і стабільність під час зберігання в різних умовах). Показано, що розроблений мікробіосенсор є стабільним, його відгуки відтворювані, а діапазон лінійності визначення субстрату знаходиться від 0 до 0,8 мМ D-серину з мінімальною межею визначення 2 мкМ.

Описаний в цій роботі мікробіосенсор можна використовувати в наступних експериментах з оптимізації його роботи в біологічних рідинах.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Oliet S. H., Mothet J. P.* Molecular determinants of D-serine-mediated gliotransmission: from release to function // *Glia*. — 2006. — V. 54, N 7. — P. 726–737.
2. *Wolosker H., Sheth K. N., Takahashi M. et al.* Purification of serine racemase: biosynthesis of the neuromodulator D-serine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1999. — V. 96, N 2. — P. 721–725.
3. *Kartvelishvily E., Shleper M., Balan L. et al.* Neuron-derived D-serine release provides a novel means to activate N-methyl-D-aspartate receptors // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281. — P. 14151–14162.
4. *Williams S. M., Diaz C. M., Macnab L. T. et al.* Immunocytochemical analysis of D-serine distribution in the mammalian brain reveals novel anatomical compartmentalizations in glia and neurons // *Glia*. — 2006. — V. 53. — P. 401–411.
5. *Schell M. J., Molliver M. E., Snyder S. H.* D-serine, an endogenous synaptic modulator: localization to astrocytes and glutamate-stimulated release // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1995. — V. 92, N 9. — P. 3948–3952.
6. *Mothet J. P., Pollegioni L., Ouanounou G. et al.* Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine // *Ibid.* — 2005. — V. 102, N 15. — P. 5606–5611.
7. *Panatier A., Theodosis D. T., Mothet J. P. et al.* Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory // *Cell*. — 2006. — V. 125. — P. 775–784.
8. *Chumakov I., Blumenfeld M., Guerassimenko O. et al.* Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D-amino acid oxidase in schizophrenia // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 2002. — V. 99, N 21. — P. 13675–13680.
9. *Shinkai T., De Luca V., Hwang R. et al.* Association analyses of the DAOA/G30 and D-amino-acid oxidase genes in schizophrenia: further evidence for a role in schizophrenia // *Neuromol. Med.* — 2007. — V. 9, N 2. — P. 169–177.
10. *Katsuki H., Nonaka M., Shirakawa H. et al.* Endogenous D-serine is involved in induction of neuronal death by N-methyl-D-aspartate and simulated ischemia in rat cerebrocortical slices // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 2004. — V. 311, N 2. — P. 836–844.
11. *Wu S-Z., Bodles A. M., Porter M. M. et al.* Induction of serine racemase expression and D-serine release from microglia by amyloid β -peptide // *J. Neuroinflam.* — 2004. — V. 1. — P. 2–12.
12. *Sasabe J., Chiba T., Yamada M. et al.* D-serine is a key determinant of glutamate toxicity in amyotrophic lateral sclerosis // *EMBO J.* — 2007. — V. 26, N 18. — P. 4149–4159.
13. *Hashimoto K., Engberg G., Shimizu E. et al.* Reduced D-serine to total serine ratio in the cerebrospinal fluid of drug naive schizophrenic patients // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych.* — 2005. — V. 29. — P. 767–769.
14. *Bendikov I., Nadri C., Amar S. et al.* A CSF and postmortem brain study of D-serine metabolic parameters in schizophrenia // *Schizophr. res.* — 2007. — V. 90, N 1–3. — P. 41–51.
15. *Tsai G., Yang P., Chung L. C. et al.* D-serine added to antipsychotics for the treatment of schizophrenia // *Biol. Psych.* — 1998. — V. 44, N 11. — P. 1081–1089.
16. *Lane H. Y., Chang Y. C., Liu Y. C. et al.* Sarcosine or D-serine add-on treatment for acute exacerbation of schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled study // *Arch. Gen. Psych.* — 2005. — V. 62, N 11. — P. 1196–1204.
17. *Hashimoto A., Oka T., Nishikawa T.* Extracellular concentration of endogenous free D-serine in the rat brain as revealed by in vivo microdialysis // *Neuroscience*. — 1995. — V. 66, N 3. — P. 635–643.
18. *Matsui T., Sekiguchi M., Hashimoto A. et al.* Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration // *J. Neurochem.* — 1995. — V. 65, N 1. — P. 454–458.
19. *Ciriacks C. M., Bowser M. T.* Measuring the effect of glutamate receptor agonists on extracellular D-serine concentrations in the rat striatum using online microdialysis-capillary electrophoresis // *Neurosci. Lett.* — 2006. — V. 393, N 2–3. — P. 200–205.
20. *Morgan M. E., Singhal D., Anderson B. D.* Quantitative assessment of blood-brain barrier damage during microdialysis // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1996. — V. 277. — P. 1167–1176.
21. *Khan A. S., Michael A. C.* Invasive consequences of using micro-electrodes and microdialysis probes in the brain // *Trend. Anal. Chem.* — 2003. — V. 22, N 8. — P. 503–508.
22. *Borland L. M., Shi G., Yang H., Michael A. C.* Voltammetric study of extracellular dopamine near microdialysis probes acutely implanted in the striatum of the anesthetized rat // *J. Neurosci. Meth.* — 2005. — V. 146. — P. 149–159.
23. *Molla G., Vegezzi C., Pilone M. S., Pollegioni L.* Overexpression in *Escherichia coli* of a recombinant chimeric *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase // *Prot. Expres. Purif.* — 1998. — V. 14, N 2. — P. 289–294.
24. *Zhang Y., Hu Y., Wilson G. S. et al.* Elimination of the acetaminophen interference in an implantable glucose sensor // *Analytical*

- Chemistry. — 1994. — V. 66, N 7. — P. 1183–1188.
25. *Moussy F., Harrison D. J., O'Brien D. W., Rajotte R. V.* Performance of subcutaneously implanted needle-type glucose sensors employing a novel trilayer coating // *Anal. Chem.* — 1993. — V. 65, N 15. — P. 2072–2077.
26. *Yang Q., Atanasov P., Wilkins E.* Development of needle-type glucose sensor with high selectivity // *Sens. Actuat. B: Chemical.* — 1998. — V. 46, N 3. — P. 249–256.
27. *Soldatkin O. O., Schuvailo O. M., Marinesco S. et al.* Microbiosensor based on glucose oxidase and hexokinase co-immobilised on platinum microelectrode for selective ATP detection // *Talanta.* — 2009. — V. 78, N 3. — P. 1023–1028.
28. *Schuvailo O. M., Soldatkin O. O., Lefebvre A. et al.* Highly selective microbiosensors for *in vivo* measurement of glucose, lactate and glutamate // *Anal. Chim. Acta.* — 2006. — V. 573–574. — P. 110–116.
29. *Солдаткін О. О., Шувайло О. М., Сеспуґліо Р., Солдаткін О. П.* Розробка високочутливого та селективного амперометричного перетворювача для створення *in vivo* біосенсорів // *Sens. Electron. Microsyst. Technol.* — 2010. — V. 1(7), N 2. — P. 51–60.
30. *Hamase K., Konno R., Morikawa A., Zaitu K.* Sensitive Determination of D-Amino Acids in Mammals and the Effect of D-Amino-Acid Oxidase Activity on Their Amounts // *Biol. Pharm. Bull.* — 2005. — V. 28, N 9. — P. 1578–1584.

РАЗРАБОТКА АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО МИКРОБИОСЕНСОРА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ D-СЕРИНА

А. А. Солдаткин

Институт молекулярной биологии
и генетики НАН Украины,
Киев

E-mail: alex_sold@yahoo.com

Создан лабораторный прототип микробиосенсора для определения концентраций D-серина. Чувствительным элементом биосенсора служит биоселективная мембрана на основе оксидазы D-аминокислот, иммобилизованной с БСА на поверхности амперометрического микропреобразователя. При оптимизации работы микробиосенсора была изучена зависимость его отклика от концентрации буфера и температуры. Показано, что микробиосенсор стабилен, его отклики воспроизводимы, а линейный диапазон определения субстрата находится в диапазоне 0–0,8 мМ D-серина с минимальным пределом определения 2 мкМ. Разработанный амперометрический микробиосенсор может с успехом использоваться для дальнейших экспериментов по оптимизации и адаптации его работы при определении концентрации уровня D-серина в различных биологических жидкостях как *in vitro*, так и *in vivo*.

Ключевые слова: D-серин, оксидаза D-аминокислот, амперометрический преобразователь, микробиосенсор, анализ *in vitro* и *in vivo*.

DEVELOPMENT OF AMPEROMETRIC MICROBIOSENSOR FOR D-SERIN DETERMINATION

O. O. Soldatkin

Institute of Molecular Biology and Genetics
of National Academy of Science of Ukraine,
Kyiv

E-mail: alex_sold@yahoo.com

A laboratory prototype of the microbiosensor for determination of D-serine concentration has been developed. The bioselective membrane on the basis of D-aminoacids oxidase, immobilized with BSA on the surface of amperometric microtransducer, has been used as a sensitive element of the biosensor. Dependence of the biosensor response on buffer concentration and temperature has been studied while optimizing the biosensor function. The microbiosensor developed has been shown to be stable, its response — reproducible, linear range of the substrate determination — within D-serine concentrations of 0–0.8 mM, minimum measurable limit — 2 μM. The amperometric microbiosensor developed can be used as well for selective monitoring for further experiments to optimize and adapt his work to determine the concentration of D-serine level in different biological liquids both *in vitro* and *in vivo*.

Key words: D-serine, D-aminoacid oxidase, amperometric transducer, microbiosensor, *in vitro* and *in vivo* analysis.