

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ В МИКРОАНАЛИЗЕ.

Выполнила: Мухаметдинова Ю.А
гр. 465-6

Проверила: Лисун Н.М
к.п.н., доцент кафедры химии и МПХ

ИММОБИЛИЗОВАННЫЕ ФЕРМЕНТЫ

- (от лат. *immobilis* - неподвижный), препараты ферментов, молекулы которых связаны с матрицей, или носителем (как правило, полимером), сохраняя при этом полностью или частично свои каталитические свойства.

АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПРОТОЧНЫЕ РЕАКТОРЫ С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ФЕРМЕНТАМИ

- Оригинальный вариант ферментного реактора предложили итальянские химики (В. Маркони и др., 1975). Они разработали метод включения фермента внутрь полых волокон триацетатцеллюлозы в момент ее формования, т. е. в момент вытягивания нити из раствора. Фермент оказывался включенным во внутреннюю полость, куда могут проникать только низкомолекулярные субстраты. Эти нити наматывали в виде катушек, заключали в стеклянную оболочку и через такой ферментный реактор пропускали анализируемую смесь.
- С помощью этого метода В. Маркони определял пенициллин, мочевины, глюкозу и другие важные для клинической химии вещества.

ФЕРМЕНТНЫЙ МИКРОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ ДАТЧИК

- состоит из двух идентичных колонок, заполненных иммобилизованным на стекле или сефарозе ферментом.
- В нижней части каждой колонки имеется термистор. Если через обе колонки прокачивается буферный раствор и никакой реакции не происходит, то разность температур между двумя термисторами равна нулю. Когда в измерительную колонку вводится буферный раствор, содержащий анализируемый субстрат, то в результате ферментативного превращения субстрата выделяется теплота. Температура в этой колонке повышается. Фиксируемая разность температур пропорциональна количеству превращенного субстрата. Преимущество такого термометрического датчика состоит прежде всего в том, что он может быть использован для любой ферментной системы, непрозрачных сред, для реакций, где не образуется окрашенного продукта. Чувствительность метода позволяет обнаруживать микромолярные количества самых

ФЕРМЕНТНЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ.

- ~~новый тип электрохимических систем в ионометрии.~~
- Они сочетают селективность и чувствительность энзимных методов анализа со скоростью и простотой измерений ионометрического метода.
- Понятие «ферментный электрод» появилось в 1967 г. после выхода из печати работ Апдайка и Хикса с описанием такого электрод для определения глюкозы.

По номенклатуре ШРАС ферментный электрод определяется как датчик, «в котором ионоселективный электрод покрыт слоем, содержащим фермент, вызывающий реакцию органического или неорганического вещества (субстрата) с образованием частиц (ионов), обуславливающих отклик электрода». В настоящее время понятие «ферментный электрод» несколько расширилось, так как в него включают электрохимические системы с ферментом, иммобилизованным не только на чувствительном элементе ионоселективного электрода, но и на носителе, расположенном на некотором расстоянии от него, или даже в

УСТРОЙСТВО ФЕРМЕНТНОГО ЭЛЕКТРОДА.

- ▣ Ферментный электрод, специфичный по отношению к определенному субстрату, как правило, можно выполнить в нескольких вариантах, различающихся типом индикаторного датчика, который регистрирует в процессе реакции изменение либо потенциала, либо тока и способом введения фермента (в растворимом или иммобилизованном виде).
- ▣ В качестве электрохимических датчиков чаще всего применяются: платиновый электрод (амперометрический); различные ионоселективные электроды (стеклянный для измерения pH); газовые электроды.
- ▣ Обычно фермент в ферментном электроде присутствует в иммобилизованном состоянии. Чаще всего применяют эти три способа иммобилизации: ковалентное связывание с поверхностью электрода; внедрение фермента в сетку геля или полимера; ковалентную сшивку молекул фермента друг с другом при помощи би- или полифункционального

-
- Ферментный электрод можно использовать для определения концентрации не только продуктов ферментативной реакции, но любого участвующего в этой реакции вещества, что особенно важно для многостадийных реакций, а также для определения активности фермента, концентраций его ингибиторов и активаторов.

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

- ▣ Применение ферментных электродов существенно расширило рамки ионометрии, позволив определять концентрацию недиссоциированных соединений и проводить анализ водных растворов многих органических соединений. Важное свойство ферментов, обеспечивающее их применение в ионометрии, уникальная специфичность по отношению к ферментативной реакции и к субстрату.
- ▣ Каждый фермент катализирует только один тип реакции; каталитическая активность фермента максимальна для определенных условий среды— оптимальных значений pH, температуры, окислительного потенциала, ее химического состава. Субстратная специфичность ферментов, выделяющая их из всех катализаторов неферментного происхождения, столь четко выражена, что фермент катализирует реакцию только одного стереоизомера или одного члена гомологического ряда, оставаясь инертным по отношению ко всем другим веществам. Таким образом, применение ферментов для создания нанометрических датчиков в первую очередь определяется их высокой селективностью.

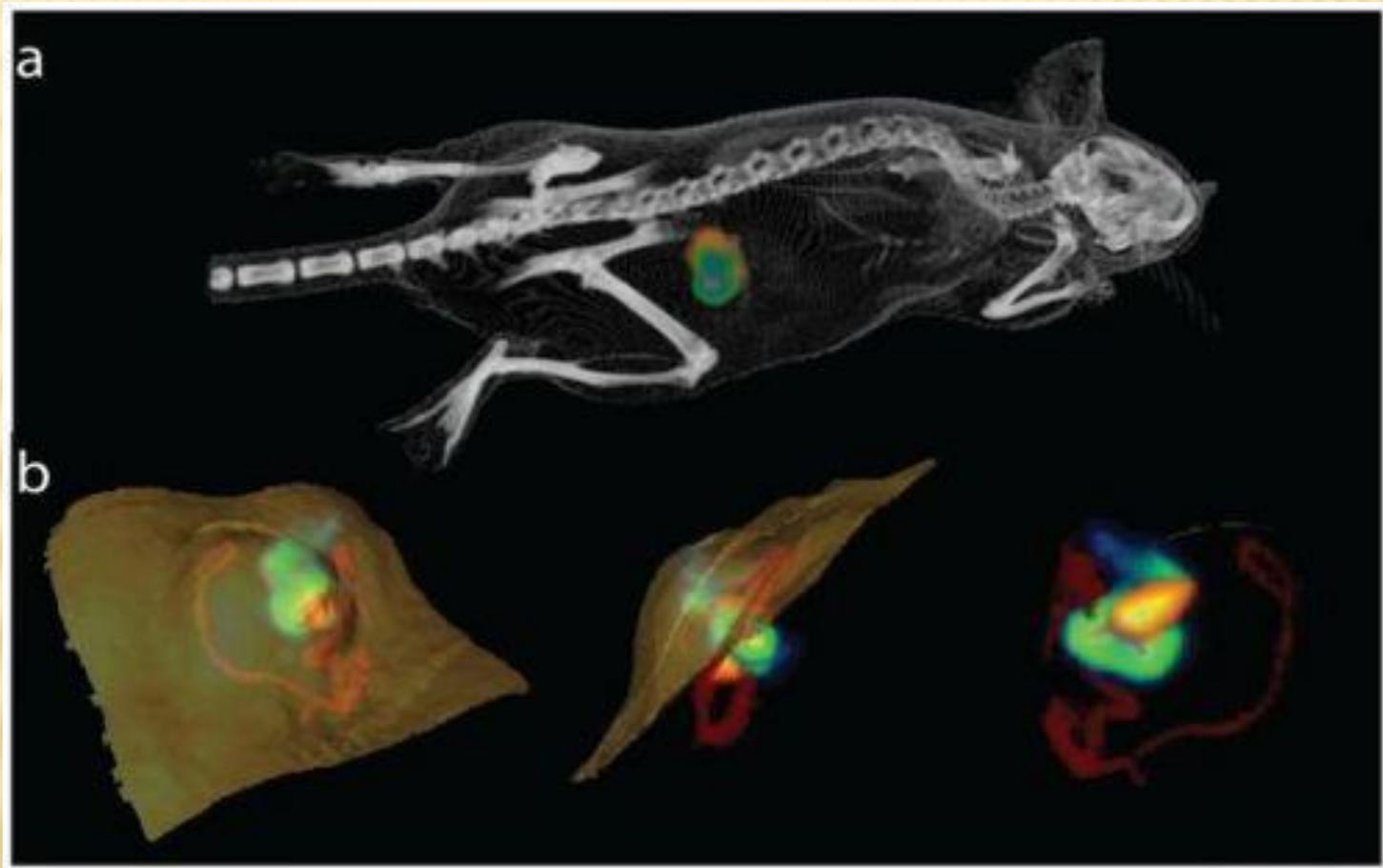
БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ МИКРОАНАЛИЗ

- является одним из наиболее перспективных экспрессных методов биологического мониторинга окружающей среды, поскольку люминесцентная система отличается высокой чувствительностью к микроколичествам загрязняющих веществ. Бiotесты на основе светящихся бактерий дают интегральную оценку токсичности и часто превосходят другие известные биотесты в скорости, точности, чувствительности и простоте использования. Ферменты бактериальной люминесцентной системы также используются в разработке высокочувствительных аналитических методов для практических целей.

ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА.

- Светящиеся штаммы бактерий из Коллекции Культур Института биофизики СО РАН (ССИБСО 836) успешно применяются для создания новых или усовершенствованных биотестов на основе лиофилизированных бактерий, несущих lux гены. Такие биотесты находят применение для анализа загрязнения воды, воздуха, почвы.

ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ОБНАРУЖЕНИИ ОПУХОЛИ.



ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ БИОСЕНСОРОВ

- Биосенсоры , датчики на основе иммобилизованных ферментов. Позволяют быстро и качественно анализировать сложные, многокомпонентные смеси веществ. В настоящее время находят все более широкое применение в целом ряде отраслей науки, промышленности, сельского хозяйства и здравоохранения, экологии и другие. Среди определяемых с помощью ферментных электродов веществ - лекарственные препараты и их метаболиты, пестициды, тяжелые металлы, биогенные амины и другие жизненно важные биологически активные вещества.