

ПОДБОР СУБСТРАТА ДЛЯ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ НА ОСНОВЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КИНЕТИКИ И ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ПЕЧАТНЫХ УГЛЕРОДНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ БИОСЕНСОРАХ

Е.А. Николаева¹, П.А. Ложкин¹, Е.А. Мучкина¹, Л.Е. Агафонова^{2*}, А.В. Кузиков², П.И. Королева², В.В. Шумянцева²

¹Юниверс Диагностикс, 121205, Москва, Большой Бульвар, д. 42, стр. 1

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10; *e-mail: agafonvaluba@mail.ru

Проведен обоснованный выбор субстрата для дальнейшего применения в электрохимическом ферментном иммуноанализе на основе параметров, описывающих ферментативную кинетику, и электрохимических характеристик продуктов электроферментативных реакций. Приведены данные анализа электрохимических характеристик печатных графитовых электродов (ПГЭ) с применением различных предобработок поверхности. С использованием предобработки ПГЭ в серной кислоте удалось добиться значительного снижения фоновых токов и снизить предел обнаружения 1-нафтола (продукта ферментативной реакции, катализируемой щелочной фосфатазой) до 0.73 мкМ в режиме дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВА) и до 0.09 мкМ в режиме хроноамперометрии (ХА) без применения дополнительных катализаторов. Выбранные субстрат и предобработка применены в количественном иммуноферментном анализе для определения прокальцитонина. Коэффициент чувствительности и предел обнаружения составили 109 нА×мл/мг и 0.8 нг/мл соответственно.

Ключевые слова: иммуносенсоры; электрохимический иммуноферментный анализ; субстраты щелочной фосфатазы; электрохимическая предобработка

DOI: 10.18097/BMCRM00281

ВВЕДЕНИЕ

Электрохимические иммуносенсоры представляют собой перспективный инструмент для детекции биомаркеров вследствие ряда преимуществ, таких как высокая чувствительность, быстрый анализ, относительная дешевизна и пригодность для миниатюризации датчиков и анализатора. Принцип электрохимических иммуносенсоров заключается в регистрации специфических комплексов, образующихся при взаимодействии антиген-антитела.

Иммуноанализ маркеров заболеваний можно условно разделить на свободный от метки или опосредованный ферментативной или иной меткой анализ [1]. Алгоритмы проведения таких анализов [2] включают как прямую регистрацию антигена, связавшегося с антителом [3, 4], так и опосредованные методы анализа, основанные на регистрации сигнала, возникающего в результате действия метки, присоединённой к компонентам реакции [5], либо с использованием меченых антител [6].

Иммуноанализ является важнейшим компонентом современной диагностики сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ). В контексте ССЗ особую клиническую значимость имеет детекция в крови миоглобина, тропонина I и тропонина T, которые служат надёжными индикаторами повреждения миокарда и используются для постановки диагноза острого коронарного синдрома и инфаркта миокарда [7].

Научные исследования в данной области сосредоточены на улучшении ключевых характеристик сенсоров (чувствительности, селективности, стабильности и воспроизводимости) за счёт использования наноматериалов

(наночастицы золота, углеродные нанотрубки, графен, допированный графен), новых биорецепторов (аптамеры, молекулярно-импринтированные полимеры как синтетические аналоги антител) и многофункциональных сенсорных платформ. Активно исследуются стратегии мультиплексного анализа для одновременного определения нескольких маркеров в одном образце, что особенно актуально для комплексной оценки состояния сердечно-сосудистой системы [8].

Ранее в наших работах был разработан электрохимический биосенсор для анализа кардиомаркеров миоглобина, тропонина I и тропонина T в плазме крови больных острым инфарктом миокарда (ОИМ) [4, 9]. Для селективного определения кардиоизоформы миоглобина, высвобождающегося в кровь при повреждении сердечной мышцы, использовали антитела к кардиомиоглобину. Миоглобин является гемопротеином, его можно зарегистрировать прямым анализом при электрохимическом восстановлении при потенциале -0.27 В (отн. Ag/AgCl). Аналитическим сигналом служила величина регистрируемого тока переноса электрона с иона железа гема на поверхность графитового электрода, модифицированного наночастицами золота, стабилизированными мембраноподобным жидкокристаллическим поверхностно-активным веществом дидецилдиметиламмоний бромидом (ДДАБ) и антителами к миоглобину. Разработанный биосенсор обладал специфичностью, высокой стабильностью и низким пределом обнаружения миоглобина – 0.25 нМ (4.4 нг/мл), широким рабочим диапазоном определяемых концентраций, достигающим 0.1 мкМ (1750 нг/мл) и покрывающим



клинический диапазон концентраций [4, 5, 9–15]. Электроанализ в таком формате не требует использования вторичных меченых антител.

Сложностью при регистрации белков-маркеров тропонинов с помощью иммуносенсоров при их взаимодействии с антителами является электрохимическая активность и белков, и антител за счет электроактивности аминокислотных остатков, входящих в их состав [16–20]. Нами был разработан метод электрохимического определения белков-маркёров ОИМ в плазме крови здоровых доноров и больных острым инфарктом миокарда с помощью регистрации сигнала наночастиц металлов методом инверсионной и квадратно-волновой вольтамперометрии [12–14]. Аналитическим сигналом служила высота катодного (восстановительного) пика оксида золота, или анодного (окислительного) пика наночастиц серебра, которую рассчитывали по полученной вольтамперометрической кривой ($\Delta I = I_{\text{сигнал}} - I_{\text{фон}}$).

В качестве метки для антител используются также ферменты, гидролизующие субстраты с образованием электроактивных или флуорогенных продуктов. Наиболее широко используемые ферменты - щелочная фосфатаза, пероксидаза, глюкозооксидаза, β -галактозидаза, а также глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа, уреаза, лакказы, каталаза [6]. Использование антител с меткой позволяет проводить анализ в формате «антиген на электроде–антитело с меткой». Такой анализ обеспечивает высокую специфичность и воспроизводимость [1, 21].

Среди ферментных меток особое место занимает щелочная фосфатаза (ЩФ), применяемая в электрохимических иммуносенсорах с 1980-х годов [22]. Субстратами ЩФ служат различные по структуре моноэфиры ортофосфорной кислоты, образующие при гидролизе соответствующие спирты. Выбор субстрата представляет собой одну из основных задач при разработке электрохимических иммуносенсоров. Образующийся спирт может быть зарегистрирован электрохимическими методами. Однако часто образующийся продукт (спирт) адсорбируется на поверхности электрода, что приводит к его загрязнению и снижению чувствительности; спирт может быть нестабильным, что снижает операционную продолжительность работы сенсора. В связи с этим при разработке иммуносенсоров необходимы дополнительные исследования как фермента-метки, так и его субстратного спектра для получения оптимальных параметров иммуноанализа [21].

Прокальцитонин (ПКТ) является идентификатором тяжелых бактериальных инфекций, а также вируса COVID-19. Нормальный уровень ПКТ в крови составляет менее 0.01 нг/мл. На данный момент предложено большое количество академических исследований и разработок по определению ПКТ как в формате с использованием метки, так и в безметочной форме [23]. При определении ПКТ описано использование фермента пероксидазы хрена [23]. Субстратом в такой системе выступает пероксид водорода, который достаточно сложно определяется электрохимическими методами анализа с использованием печатных графитовых электродов из-за замедленной кинетики гетерогенного переноса электрона на поверхности ПГЭ. Поэтому часто предобработка ПГЭ является неотъемлемой стадией при разработке иммуносенсоров [24]. В связи с этим наиболее перспективно использование в качестве метки фермента

щелочной фосфатазы, имеющей широкую субстратную специфичность [25].

Цель настоящего исследования – подбор субстрата для щелочной фосфатазы в рамках экспериментального исследования по разработке иммуносенсора на прокальцитонин. В связи с поставленной целью сформулированы следующие задачи:

- провести электроанализ субстратов ЩФ (п-нитрофенилфосфат (pNPP), фосфат аскорбиновой кислоты (AA2P), *n*-аминофенилфосфат (pAPP) и 1-нафтилфосфат (1-NPP));
- исследовать ферментативную кинетику в отношении оптимального субстрата ЩФ;
- охарактеризовать поверхность ПГЭ электрохимическими методами для обоснованного выбора способа предобработки электродной поверхности;
- провести электрохимический иммуноферментный анализ с выбранным субстратом и обработкой поверхности ПГЭ в формате «сэндвич» анализа на прокальцитонин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Электрохимические измерения проводили с использованием потенциостата EmStat4s («PalmSens B.V.», Нидерланды) с программным обеспечением PStace (версия 5.11). В работе использовали печатные графитовые электроды (ПГЭ) – трехэлектродные системы, изготовленные послойно методом трафаретной печати. Рабочий и вспомогательный электроды формировали из углеродной пасты («Sun Chemical», США), электрод сравнения — из хлоридсеребряной пасты («Дельта-пасты», Россия). Диаметр рабочего электрода составлял 1.8 мм (геометрическая площадь поверхности 2.54 мм²). Все потенциалы приведены относительно хлоридсеребряного электрода сравнения (отн. Ag/AgCl).

Для исследования ферментативной кинетики в работе были использованы следующие реактивы: 1-нафтилфосфат, моноватриевая соль моногидрат (1-NPP) («TCI», Япония), тринатриевая соль 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты (AA2P) («Solarbio», Китай), *n*-нитрофенилфосфат динатриевая соль гексагидрат (pNPP) («SRL», Индия), 4-аминофенил фосфат моноватриевая соль гидрат (pAPP) («Biosynth», Великобритания), 1-нафтол («ЛенРеактив», Россия), рекомбинантная щелочная фосфатаза (pЩФ) в 20 мМ фосфатном буфере pH 7.4 с заявленной активностью >7100 Ед/мг («Raymebio», Китай). В качестве раствора-электролита для проведения реакций субстрата с ЩФ использовали 50 мМ диэтаноламиновый буфер pH 9.5 (далее обозначается DEA), состоящий из 50 мМ диэтанолamina («SRL», Индия), 5 мМ хлорид магния («Реахим», Россия), 100 мМ хлорида калия («Реахим»). В работе использовали раствор, содержащий эквивалентное количество 1 мМ гексацианоферрата(II) калия и 1 мМ гексацианоферрат(III) калия («Универхимик», Россия) в качестве редокс-зонда и 10 мМ фосфатный буферный раствор, pH 7.5 (PBS) для электрохимических экспериментов. При проведении иммуноферментного анализа (ИФА) с электрохимической детекцией использовали: в качестве захватывающих антител (Ab₁) – моноклональные антитела (АТ) к ПКТ («Auker Biotech», Китай), в качестве детектирующих

антител – поликлональные АТ к ПКТ («Hytest», Россия), меченные ЩФ «Raymebio» (Ab_2 –ЩФ), прокальцитонин («Hytest») (ПКТ). Следующие реагенты использовали для приготовления растворов: Tween-20 («Русхим», Россия), бычий сывороточный альбумин (BSA) («Helicon», Россия). В качестве твёрдого «носителя» для Ab_1 использовали магнитные наночастицы с тозил-активированной поверхностью (Mag-Tosyl) («Bioeast», Китай). Реакцию связывания проводили в иммунологических планшетах medisorp («Sovtech», Россия). Все используемые реагенты имели квалификацию не ниже х.ч. Все растворы и электролиты приготовлены на основе деионизированной воды (Milli-Q).

Методы

Предобработку электрода проводили в 10 mM PBS методом хроноамперометрии (ХА) в течение 10 мин при потенциале 1.6 В.

Построение кривых, отвечающих ферментативной кинетике Михаэлиса-Ментен, проводили на основе экспериментов с инкубированием 2 нМ рЩФ с известной концентрацией субстрата в течение 20 мин при комнатной температуре (~25°C) в буфере DEA. Концентрацию субстрата повышали до достижения плато. Для каждой регистрируемой концентрации использовали новый электрод, измерения воспроизводили дважды. После инкубации регистрировали токи в режиме дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВА) при скорости сканирования 20 мВ/с в буфере DEA.

Расчет активности рЩФ относительно выбранного субстрата проводили после 20- минутной инкубации 1 mM 1-нафтилфосфата с различным количеством фермента в буфере DEA. После инкубации регистрировали токи в режиме ДИВА в диапазоне потенциалов от -0.3 В до 0.4 В при скорости сканирования 20 мВ/с и хроноамперометрии (ХА) при потенциале 0.15 В в течение 60 с. Для оценки количества продукта, образуемого во время каталитической реакции субстрата с ферментом, строили калибровочные зависимости окисления известной концентрации 1-нафтола на электродах, предобработанных в 10 mM PBS, как описано выше. Активность рЩФ сопоставляли с концентрацией образовавшегося продукта. Для анализа, расчета скорости ферментативной реакции и констант Михаэлиса применяли программное обеспечение Origin 2021 («Origin Lab», США).

Для характеристики поверхности ПГЭ применяли циклическую вольтамперометрию (ЦВА), измерения проводили в диапазоне потенциалов от -0.5 В до 0.5 В в растворе, содержащем ионы переменной валентности $[Fe(CN)_6]^{4-/3-}$, при различных скоростях сканирования потенциала (от 400 мВ/с до 10 мВ/с); спектроскопию импеданса (EIS) измеряли при потенциале половины окислительного пика, который был установлен по ЦВА, амплитуда (E_{ac}) составляла 10 мВ, диапазон частот составил от 50000 Гц до 0.1 Гц. Предобработку в 10 mM PBS проводили как описано выше. Предобработку серной кислотой осуществляли в 0.2 М растворе серной кислоты в режиме ЦВА (1 цикл) в диапазоне потенциалов от -1.2 В до 1.5 В при скорости сканирования 100 мВ/с.

Проведение ИФА включало классические стадии «сэндвич» анализа: 30-минутная инкубация Ab_1 – ПКТ (Ab_1 500 нг/лунку) при 37°C в термощейкере («Elmi», Латвия);

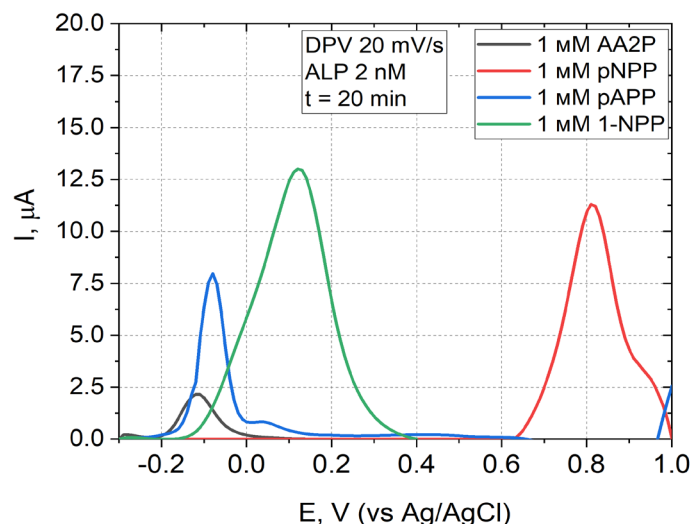


Рисунок 1. Вольтамперограммы, полученные методом ДИВА для ПГЭ (обработка в 10 mM PBS, 1.2 В, 10 мин) в растворе буфера (DEA) после 20-минутной инкубации 1 mM определенного субстрата и 2 нМ рЩФ (скорость сканирования 20 мВ/с).

промывка с помощью магнитной сепарации раствором 1x PBST; 30-минутная инкубация Ab_1 – ПКТ с Ab_2 – ЩФ (концентрированный раствор Ab_2 5.7 мг/мл разбавляли в 500 раз) при 37°C в термощейкере; промывка с помощью магнитной сепарации раствором 1xPBST (10 mM PBS + 0.05% Tween-20); 20-минутная инкубация с раствором субстрата (1 mM) при комнатной температуре. После последнего шага применяли магнитную сепарацию частиц, отбирали продукт ферментативной реакции с помощью дозатора (80 мкл), наносили пробу на ПГЭ и проводили измерение в режиме ДИВА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методика выбора субстрата для рЩФ

Щелочная фосфатаза – фермент класса гидролаз, катализирующий отщепление фосфатной группы от различных молекул. Результатом взаимодействия рЩФ с ее субстратом является электроактивный продукт, способный к прямому окислению на электроде [6]. Для исследования ферментативной кинетики и получения электрохимических характеристик окисления продуктов использовали ПГЭ, обработанные в PBS.

В качестве субстратов были проанализированы п-нитрофенилфосфат (pNPP), фосфат аскорбиновой кислоты (AA2P), *n*-аминофенилфосфат (pAPP) и 1-нафтилфосфат (1-NPP) [2, 26]. В результате ферментативной реакции, катализируемой ЩФ, образуются нитрофенол, аскорбиновая кислота, аминфенол и нафтол соответственно. Появление пика окисления продукта после 20-ти минутной инкубации фермента и субстрата зарегистрировано с помощью ДИВА и представлено на рисунке 1. Наиболее положительным потенциалом окисления обладает *n*-нитрофенол – продукт ферментативной реакции субстрата *n*-нитрофенилфосфата (p-NPP), пик которого регистрируется при потенциале 0.85 В. При построении графиков фоновый ток был вычтен. Экспериментально установлено, что ни субстрат, ни фермент не окисляются на электроде в исследуемом диапазоне потенциалов.

Таблица 1. Параметры линейной аппроксимации зависимости тока прямого окисления 1-нафтола от его концентрации на ПГЭ после обработки в PBS (ХА, 1.2В, 10 мин).

Режим детекции	LOD (NAP), мМ	k, мкА/мМ	b, мкА	SD фона, мкА	R ²	E, В
ДИВА	0.068	4.26	1.34	±0.097	0.97	0.15
ХА	0.0027	0.90	0.031	±0.00082	0.98	0.15 (60с)

На основе данных, полученных с помощью ДИВА, была построена зависимость в координатах $i([S])$, где i – ток пика окисления продукта. Зависимость тока окисления продукта от начальной концентрации субстрата была аппроксимирована регрессией Михаэлиса-Ментен [27–29] в соответствии с уравнением (1).

$$i = \frac{V_{max} * [Subs]}{K_m + [Subs]} \quad (1)$$

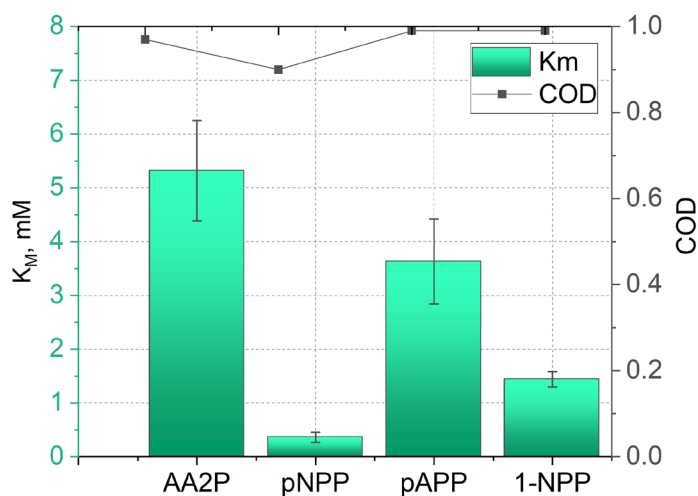
Характеристики субстратов при аппроксимации данных уравнением 1 представлены на рисунке 2. Таким образом, наибольшим значением кажущейся K_m обладает субстрат 2-фосфо-L-аскорбиновая кислота (AA2P), что в рамках теории соответствует наихудшему связыванию субстрата с ферментом ПЦФ. Коэффициент детерминации (COD, R²) во всех случаях составил не менее 0.9.

На основании анализа кинетических характеристик (рис. 2), учитывая коэффициент детерминации (R²) и потенциал электроокисления продуктов ферментативной реакции рПЦФ с субстратами, был сделан выбор в пользу субстрата 1-нафтилфосфата (1-NPP), продукт ферментативной реакции которого – нафтол – окисляется при потенциале 0.15 В (отн. Ag/AgCl) и имеет наименьшее значение K_m среди продуктов, окисляющихся при сравнительно низких потенциалах.

Исследование ферментативной активности в отношении выбранного субстрата

Калибровочные зависимости тока от концентрации продукта ферментативной реакции 1-нафтола строили из данных, полученных: 1) в режиме ДИВА при потенциале 0.15 В и 2) в режиме ХА при потенциале 0.15 В (60 с). В таблице 1 приведены параметры полученных зависимостей, аппроксимированные линейной регрессией, выражающейся в общем уравнении: $i(\text{мкА}) = k(\text{мкА/мМ}) \times [\text{NAP}](\text{мМ}) \pm b(\text{мкА})$. Предел обнаружения (LOD, limit of detection) рассчитывали по уравнению $3 \times \text{SD}/k$; в качестве фонового тока выступал ток, зарегистрированный в DEA буфере [30]. Из полученных данных следует, что показатель чувствительности (k) значительно выше при регистрации токов в режиме ДИВА. Однако ХА режим обеспечивает меньший предел обнаружения продукта благодаря снижению шумов при длительной стабилизации тока. Таким образом, выбор метода детекции определяется целевыми параметрами разрабатываемого датчика.

Величины токов, полученные после инкубации рПЦФ с субстратом 1-нафтилфосфатом (1-NPP) в течение 20 мин, подставляли в уравнение линейной зависимости тока от концентрации 1-нафтола и находили концентрацию продукта, синтезированного во время ферментной реакции. Рост активности фермента с увеличением его концентрации

**Рисунок 2.** Сравнение Констант Михаэлиса (K_m) для различных субстратов, а также коэффициент детерминации (R²) данных к уравнению 1.

в системе демонстрирует применимость 1-NPP в иммуносенсорах, где сигнал пропорционален содержанию биомаркера (табл. 2). Для сравнения в таблице 2 приведены данные для активности фермента с фосфатом аскорбиновой кислоты (AA2P) в качестве субстрата. Из таблицы 2 видно, что активность рПЦФ с 1-NPP в качестве субстрата в 4–6 раз превышает активность фермента с AA2P, что коррелирует с более низкой величиной K_m для 1-NPP (рис. 2) и подтверждает его преимущество в анализах, требующих высокой скорости гидролиза.

Таким образом, 1-NPP является оптимальным субстратом для электрохимического определения активности рПЦФ благодаря высокой скорости ферментативной реакции и низкому потенциалу окисления нафтола. Полученные данные подтверждают возможность интеграции 1-NPP в формат иммуносенсоров для лабораторной диагностики.

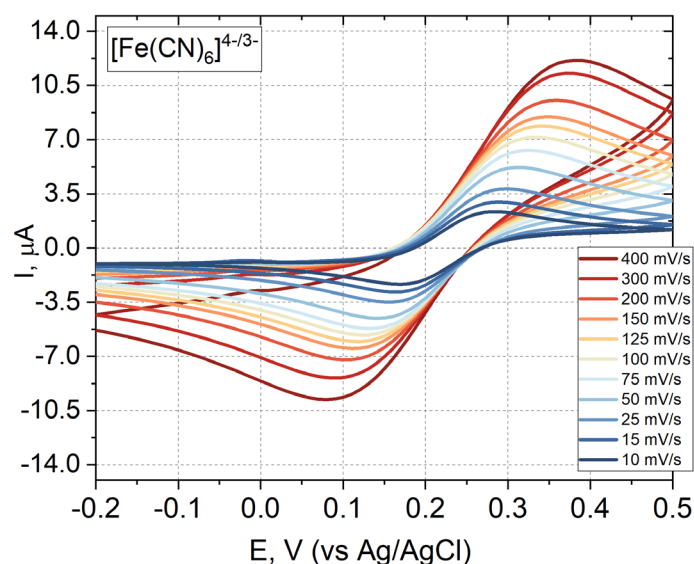
Достижение более низкого предела обнаружения продукта ферментативной реакции за счет простой предобработки электрода

Экспериментальный анализ условий пробоподготовки стабильных электродов с хорошими электроаналитическими характеристиками.

Параметры электрохимической реакции. В предыдущем разделе был подобран оптимальный для ПЦФ на основе электрохимических характеристик, полученных при электроокислении продукта ферментативной реакции на электроде. При разработке электрохимического ферментного иммуносенсора важным этапом является не только подбор оптимального субстрата для фермента, но и достижение оптимальных характеристик поверхности электрода для оптимизации отклика при окислении продукта. Для подбора субстрата использовали обработку ПГЭ в PBS в течение 10 мин. Чтобы добиться лучшего отклика относительно 1-нафтола (продукта ферментативной реакции

Таблица 2. Активность фермента рЩФ для субстратов 1-нафтил фосфата (1-NPP) и 2-фосфо-L-аскорбиновой кислоты (AA2P).

Субстрат	Режим детекции тока	Концентрация рЩФ, нМ			Активность рЩФ, мкМ/мин
		0.2	1	2	
AA2P	ДИВА	2.74	13.50	18.35	
	ХА	3.82	14.36	21.78	
1-NPP	ДИВА	13.01	33.05	56.91	
	ХА	15.85	36.22	45.11	

**Рисунок 3.** ЦВА для немодифицированных ПГЭ без предобработки в растворе ферри/ферроцианида калия в качестве внешнего электролита при разных скоростях развертки потенциала.

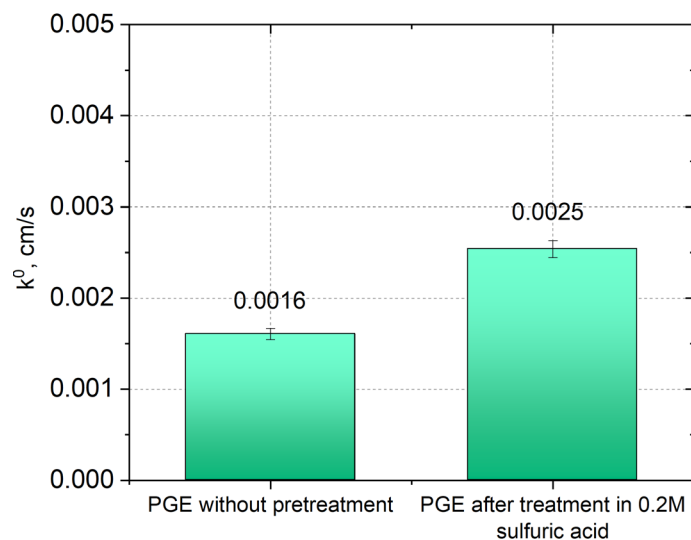
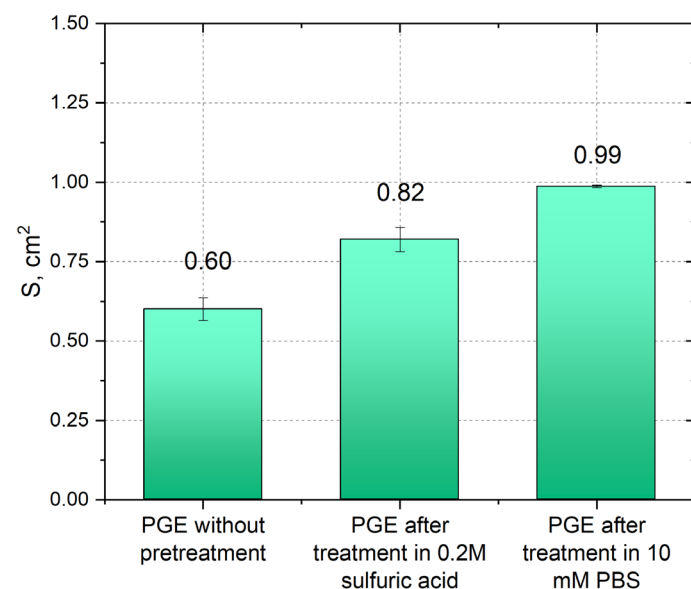
1-нафтилфосфата, 1-NPP) и снижения предела обнаружения применили обработку электрода серной кислотой. Для сравнения влияния различных предобработок использовали методы ДИВА и ХА [31].

В электрохимии оценка константы скорости переноса электронов k^0 представляет первостепенный интерес при изучении характеристик электродных материалов. Константа скорости даёт представление о скорости переноса электронов между электроактивным веществом и поверхностью электрода, и о том, определяет ли материал электрода общую скорость электрохимической реакции [32].

Самым широко используемым методом определения k^0 является циклическая вольтамперометрия [19, 32]. На рисунке 3 приведена ЦВА для ПГЭ до обработки в эквимольном растворе ферри/ферроцианида калия в качестве внешнего электролита при разных скоростях сканирования.

На рисунке 4 представлено сравнение констант гетерогенного переноса электрона для ПГЭ без предобработки и после обработки серной кислотой. Константа скорости переноса электрона после обработки серной кислотой увеличивается. При обработке в PBS реакция переставала иметь квазиобратимый характер и расстояние между пиками не изменялось с изменением скорости

Площадь электроактивной поверхности электрода находили из данных ЦВА при разных скоростях развертки по уравнению Рейнольдса-Шевчика при 25 °C [27].

**Рисунок 4.** Сравнение k^0 для ПГЭ без предобработки и после обработки серной кислотой.**Рисунок 5.** Сравнение электроактивных площадей до и после предобработки ПГЭ (геометрическая площадь поверхности 2.54 мм² (0.0254 см²)).

На рисунке 5 представлено сравнение электроактивных площадей до и после обработки электродов в PBS и в серной кислоте.

Наибольший вклад в улучшение характеристик электрохимического процесса с участием редокс пары $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ дает обработка фосфатным буферным раствором в режиме ХА.

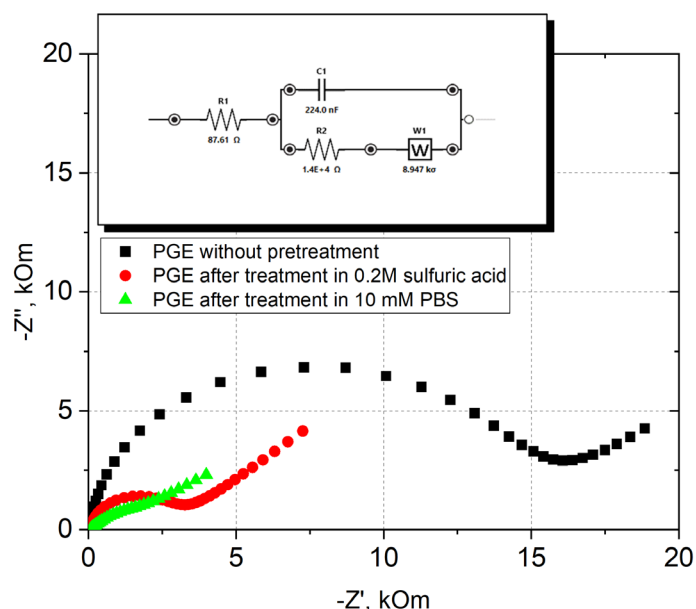


Рисунок 6. Профили EIS для перехода $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ в 1 М КСl для электродов ПГЭ без предобработки (черная линия) и после обработки серной кислотой (красная линия) или в PBS (зеленая линия). Диапазон частот – 50000-0.1 Гц; амплитуда переменного тока – 10 мВ; 9.7 частот на декаду; потенциал постоянного тока = $E_{1/2}$.

Поскольку данные ЦВА при разных скоростях развертки потенциала не дали возможности для расчета k^0 по методу Никольсона для ПГЭ, обработанных в PBS, так как процесс стал преимущественно обратимым (разница между пиками от 10 до 400 мВ/с не менялась и составила 90.7 мВ), для вычисления константы гетерогенного переноса были использованы данные спектроскопии электрохимического импеданса (EIS).

Из рисунка 6 видно снижение сопротивления переноса электрону при использовании предобработок в серной кислоте и PBS. На вставке представлена эквивалентная схема химической реакции для аппроксимации и расчета значений элементов, входящих в ее состав (схема соответствует классической цепи Рэндлса [32], ошибка при моделировании процесса химической реакции, аппроксимирующей схемой для элемента, отвечающего сопротивлению переноса электрона, не превышала 1.8 %).

При расчете константы гетерогенного переноса использовали среднее значение электроактивной площади поверхности, полученной по данным ЦВА. На рисунке 7 представлено соотношение изменения основных электрохимических параметров при предварительной обработке электрода. Наблюдается закономерное снижение R_{ct} и увеличение A и k^0 при обработке в кислоте и PBS.

Обработка как кислотой, так и PBS значительно снижает сопротивление переносу электрона, за счет чего константа гетерогенного переноса возрастает в 10 раз по сравнению с исходной поверхностью.

Сравнение предобработок ПГЭ при прямом окислении продукта ферментативной реакции (1-нафтола). На рисунке 8 приведены значения токов, регистрируемые в диэтаноламиновом электролите (фоновые токи DEA), на ПГЭ после различной предобработки. Из рисунка 8 видно, что обработка в серной кислоте значительно снижает фоновые токи (в 25 раз относительно

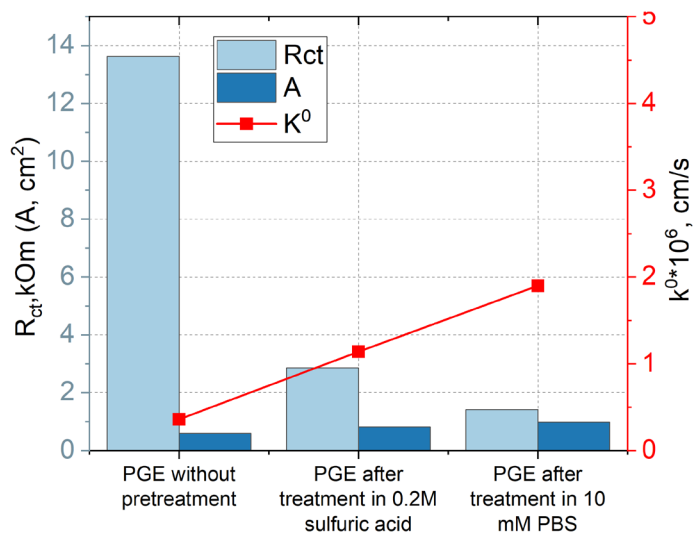


Рисунок 7. Сравнение основных электрохимических параметров, рассчитанных по данным EIS и ЦВА для ПГЭ до обработки и после.

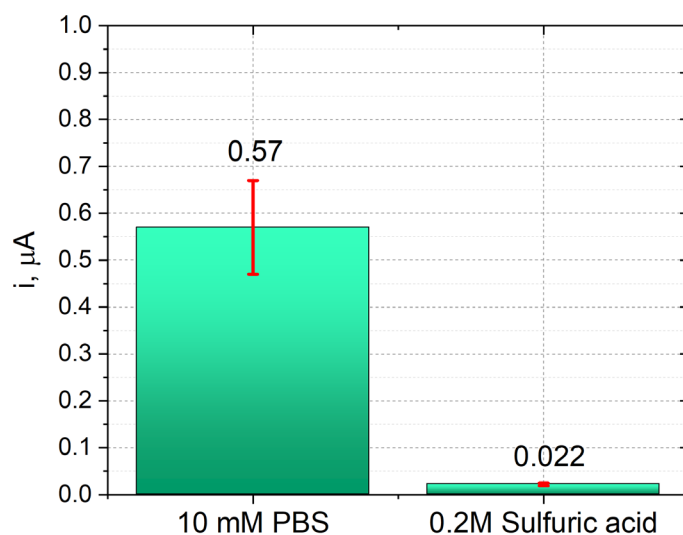


Рисунок 8. Значение тока, регистрируемого в фоновом электролите (50 mM DEA), на ПГЭ с различной предобработкой.

обработки в PBS), также стандартное отклонение фоновых токов снижается с ± 0.1 мкА до ± 0.003 мкА.

За счет снижения фонового тока удалось добиться лучшего предела обнаружения относительно нафтола. Для ПГЭ, обработанных в серной кислоте, так же, как и для ПГЭ с предобработкой в PBS, были зарегистрированы токи прямого окисления нафтола на электроде в режимах ДИВА и ХА. На рисунке 9 представлены соответствующие концентрационные зависимости тока электроокисления нафтола.

Таким образом, обработка ПГЭ электродов серной кислотой способствует снижению предела обнаружения (LOD) по 1-нафтолу с 68 мкМ до 0.73 мкМ в режиме ДИВА, и с 2.70 мкМ до 0.09 мкМ в режиме ХА относительно электродов, обработанных в 10 mM PBS.

Электрохимический иммуноферментный анализ с оптимальным субстратом рЩФ и обработкой поверхности ПГЭ в формате «сэндвич» анализа на прокальцитонин

Для проведения ИФА с электрохимической детекцией были использованы захватывающие моноклональные

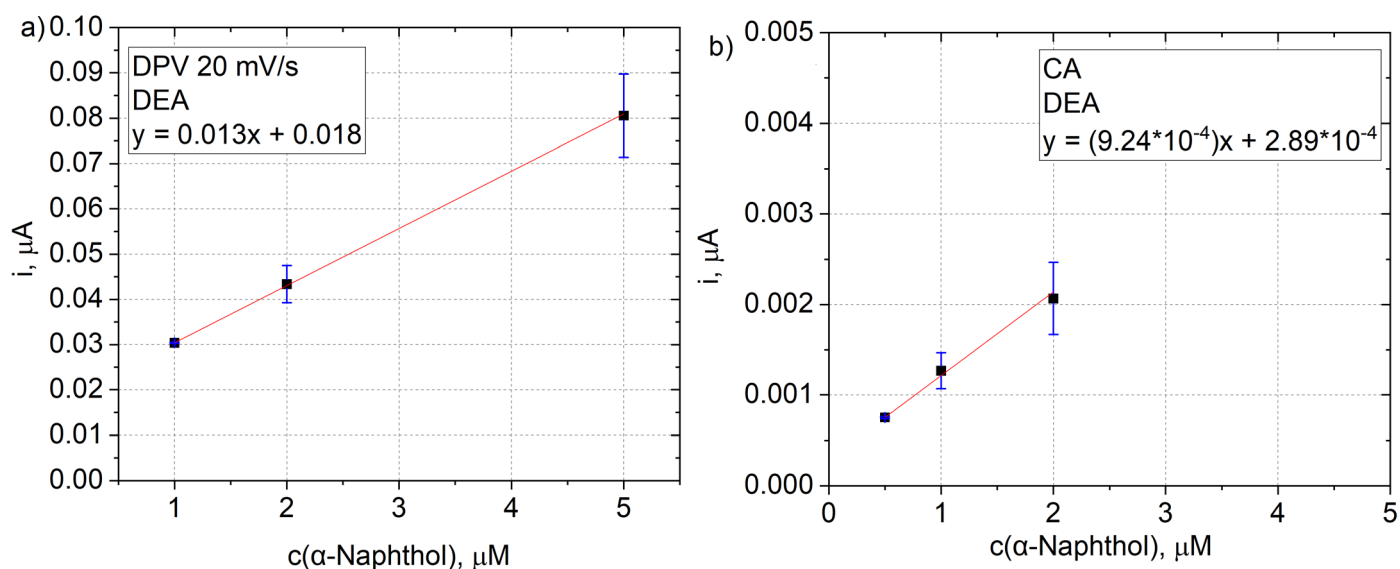


Рисунок 9. Концентрационные зависимости тока при окислении α -нафтола, зарегистрированные в DEA буфере, на ПГЭ, обработанных в серной кислоте в режимах: (а) ДИВА и (б) ХА.

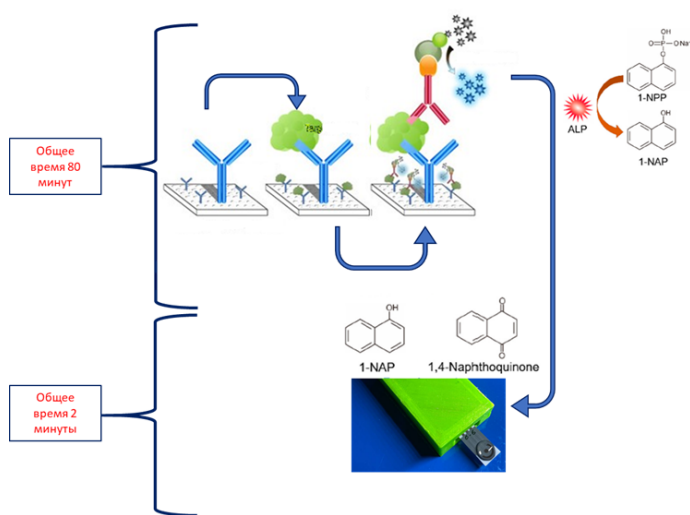


Рисунок 10. Схема иммуноферментного анализа с электрохимической детекцией.

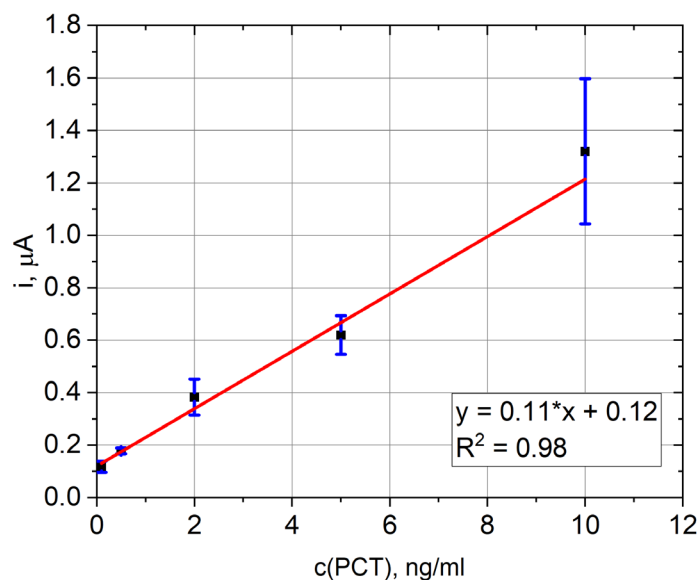


Рисунок 11. Зависимость тока от концентрации прокальцитонина.

антитела к прокальцитонину, сорбированные на магнитные наночастицы и детектирующие поликлональные антитела, меченные ЦФ. Имунная реакция связывания антигена с антителом проходила в плашках вне зоны ПГЭ. Процесс занимал 80 мин и подробно описан в разделе «Методика». После проведения ферментативной реакции в присутствии субстрата (1-NPP), отбирали 80 мкл продукта ферментативной реакции (1-нафтола), наносили пробу на ПГЭ и проводили измерение в режиме ДИВА (рис. 10).

Разработанный иммуносенсор с электрохимической детекцией был опробован на образцах ПКТ. На рисунке 11 представлена зависимость тока от концентрации прокальцитонина (ПКТ) в модельных буферных растворах (PBS).

Предел обнаружения составил 0.8 пг/мл. Коэффициент чувствительности - 109 нА×мл/мг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен электроанализ субстратов ЦФ (п-нитрофенилфосфат (pNPP), фосфат аскорбиновой

кислоты (AA2P), *n*-аминофенилфосфат (pAPP) и 1-нафтилфосфат (1-NPP)). Исследована ферментативная кинетика в отношении лучшего субстрата ЦФ — 1-NPP. Охарактеризована поверхность ПГЭ электрохимическими методами для обоснованного выбора способа предобработки электродной поверхности. С использованием предобработки ПГЭ в серной кислоте удалось добиться значительного снижения фонового тока и снизить предел обнаружения 1-нафтола, который является продуктом ферментативной реакции, катализируемой щелочной фосфатазой, с 68 мкМ до 0.73 мкМ в режиме дифференциально-импульсной вольтамперометрии и с 2.70 мкМ до 0.09 мкМ в режиме хроноамперометрии. Выбранные субстрат и предобработка применены в количественном иммуноферментном анализе для определения прокальцитонина в стандартных растворах. Коэффициент чувствительности и предел обнаружения составили 109 нА×мл/мг и 0.8 нг/мл соответственно.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период 2021–2030 годы (№ 122030100168-2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА

1. Police Patil, A.V., Chuang, Y.-S., Li, C., Wu, C.-C. (2023) Recent Advances in Electrochemical immunosensors with nanomaterial assistance for signal amplification. *Biosensors*, **13**(1), 125. DOI: 10.3390/bios13010125
2. Chen, H., Zhang, J., Huang, R., Wang, D., Deng, D., Zhang, Q., Luo, L. (2023) The Applications of electrochemical immunosensors in the detection of disease biomarkers: a review. *Molecules*, **28**(8), 3605. DOI: 10.3390/molecules28083605
3. Archakov, A.I., Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Kurny'shova, A.V., Vagin, M.Y. (2008) Electrochemical biosensor for direct determination of myoglobin and method for its production, Russian State Patent Agency Certificate, No. RU 2367958 C1 of 17.01.2008. <https://www.fips.ru/cdfi/fips.dll/ru?ty=29&docid=2367958>
4. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Vagin, M.Yu., Suprun, E.V., Archakov, A.I. (2010) Electrochemical immunoanalysis of cardiac myoglobin. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **56**(6), 758–768. DOI: 10.18097/PBMC20105606758
5. Shumkov, A.A., Suprun, E.V., Shatinina, S.Z., Lisitsa, A.V., Shumyantseva, V.V., Archakov, A.I. (2013) Gold and silver nanoparticles for electrochemical detection of cardiac troponin i based on stripping voltammetry. *BioNanoScience*, **3**(2), 216–222. DOI: 10.1007/s12668-013-0090-9
6. Bartlett, P.N. (2008) *Bioelectrochemistry: fundamentals, experimental techniques and applications*. John Wiley & Sons, 494 p.
7. Gerdan, Z., Saylan, Y., Denizli, A. (2024) Biosensing platforms for cardiac biomarker detection. *ACS Omega*, **9**(9), 9946–9960. DOI: 10.1021/acsomega.3c06571
8. Nazir, S., Iqbal, R.A. (2023) Biosensor for rapid and accurate detection of cardiovascular biomarkers: Progress and prospects in biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **14**, 100388. DOI: 10.1016/j.biosx.2023.100388
9. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Suprun, E.V., Kuzikov, A.V., Agafonova, L.E., Archakov, A.I. (2015) Electrochemical methods for biomedical investigations. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **61**(2), 188–202. DOI: 10.18097/PBMC20156102188
10. Suprun, E., Bulko, T., Lisitsa, A., Gnedenko, O., Ivanov, A., Shumyantseva, V., Archakov, A. (2010) Electrochemical nanobiosensor for express diagnosis of acute myocardial infarction in undiluted plasma. *Biosensors and Bioelectronics*, **25**(7), 1694–1698. DOI: 10.1016/j.bios.2009.12.009
11. Shumyantseva, V.V., Suprun, E.V., Bulko, T.V., Archakov, A.I. (2010). Gemoproteiny i sensornyye sistemy medicinskogo naznacheniya na ix osnove. In *Khimicheskii analiz v meditsinskoi diagnostike* (Chemical Analysis in Clinical Diagnostics), Moscow, Nauka, pp. 181–211.
12. Shumkov, A.A., Suprun, E.V., Shumyantseva, V.V., Archakov, A.I. (2010) Sensornyye i lektrokhimicheskie sistemy dlya analiza kardiomioglobina. *Biomedicina*, **1**(5), 146–148.
13. Suprun, E.V., Shilovskaya, A.L., Lisitsa, A.V., Bulko, T.V., Shumyantseva, V.V., Archakov, A.I. (2011) Electrochemical immunosensor based on metal nanoparticles for cardiac myoglobin detection in human blood plasma. *Electroanalysis*, **23**(5), 1051–1057. DOI: 10.1002/elan.201000668
14. Shumyantseva, V.V., Bulko, T.V., Suprun, E.V., Archakov, A.I. (2013) Electrochemical sensor systems based on one-dimensional (1D) nanostructures for analysis of bioaffinity interactions. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **59**(2), 209–218. DOI: 10.18097/pbmc20135902209
15. Shumkov, A.A., Suprun, E.V., Shumyantseva, V.V., Archakov, A.I. (2011) Sensornyye i lektrokhimicheskie sistemy dlya analiza kardiomioglobina. *Biomedicina*, **1**(3), 46–49.
16. Brabec, V., Mornstein, V. (1980) Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, **625**(1), 43–50. DOI: 10.1016/0005-2795(80)90106-3
17. Reynaud, J.A., Malfroy, B., Bere, A. (1980) The electrochemical oxidation of three proteins: RNAase A, bovine serum albumin and concanavalin A at solid electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **116**, 595–606. DOI: 10.1016/S0022-0728(80)80281-6
18. Brabec, V., Mornstein, V. (1980) Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. *Biophysical Chemistry*, **12**(2), 159–165. DOI: 10.1016/0301-4622(80)80048-2
19. Malfroy, B., Reynaud, J.A. (1980) Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **114**(2), 213–223. DOI: 10.1016/S0022-0728(80)80448-7
20. Reynaud, J.A., Malfroy, B., Canesson, P. (1980) Electrochemical investigations of amino acids at solid electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, **114**(2), 195–211. DOI: 10.1016/S0022-0728(80)80447-5
21. Kim, J., Park, M. (2021) Recent progress in electrochemical immunosensors. *Biosensors*, **11**(10), 360. DOI: 10.3390/bios11100360
22. Heineman, W.R., Halsall, H.B. (1985) Strategies for electrochemical immunoassay. *Analytical Chemistry*, **57**(12), 1321A–1331A. DOI: 10.1021/ac00289a804
23. Nellaippan, S., Mandali, P.K., Prabakaran, A., Krishnan, U.M. (2021) Electrochemical immunosensors for quantification of prolactin: progress and prospects. *Chemosensors*, **9**(7), 182. DOI: 10.3390/chemosensors9070182
24. González-Sánchez, M.I., Gómez-Monedero, B., Agrisuelas, J., Iniesta, J., Valero, E. (2019) Electrochemical performance of activated screen printed carbon electrodes for hydrogen peroxide and phenol derivatives sensing. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **839**, 75–82. DOI: 10.1016/j.jelechem.2019.03.026
25. Huang, J., Zu, Y., Zhang, L., Cui, W. (2024) Progress in prolactin detection based on immunoassay. *Research*, **7**, 0345. DOI: 10.34133/research.0345
26. Bekhit, M., Blazek, T., Gorski, W. (2021) Electroanalysis of enzyme activity in small biological samples: alkaline phosphatase. *Analytical Chemistry*, **93**(42), 14280–14286. DOI: 10.1021/acs.analchem.1c03372
27. Bard, A.J., Faulkner, L.R. (2001) *Electrochemical methods - fundamentals and applications* (2nd ed). Wiley, 850 p.
28. Saxena, R., Srivastava, S. (2019) An insight into impedimetric immunosensor and its electrical equivalent circuit. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **297**, 126780. DOI: 10.1016/j.snb.2019.126780
29. Shumyantseva, V.V., Kuzikov, A.V., Masamreh, R.A., Bulko, T.V., Archakov, A.I. (2018) From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450. *Biosensors and Bioelectronics*, **121**, 192–204. DOI: 10.1016/j.bios.2018.08.040
30. Zhao, N., Shi, J., Li, M., Xu, P., Wang, X., Li, X. (2022) Alkaline Phosphatase electrochemical micro-sensor based on 3D graphene networks for the monitoring of osteoblast activity. *Biosensors*, **12**(6), 406. DOI: 10.3390/bios12060406
31. Morrin, A., Killard, A.J., Smyth, M.R. (2003) Electrochemical characterization of commercial and home-made screen-printed carbon electrodes. *Analytical Letters*, **36**(9), 2021–2039. DOI: 10.1081/AL-120023627
32. Randviir, E.P. (2018) A cross examination of electron transfer rate constants for carbon screen-printed electrodes using Electrochemical Impedance Spectroscopy and cyclic voltammetry. *Electrochimica Acta*, **286**, 179–186. DOI: 10.1016/j.electacta.2018.08.021

Поступила: 04.06.2025
После доработки: 14.10.2025
Принята к публикации: 07.11.2025

JUSTIFIED CHOICE OF A SUBSTRATE FOR ALKALINE PHOSPHATASE BASED ON THE ENZYMATIC KINETICS AND ELECTROCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SCREEN-PRINTED CARBON ELECTRODES IN IMMUNOSENSORS

*E.A. Nikolaeva¹, P.A. Lozhkin¹, E.A. Muchkinova¹, L.E. Agafonova^{*2}, A.V. Kuzikov², P.I. Koroleva², V.V. Shumyantseva²*

¹Univers Diagnostics, 42/1 Bolshoy Bulvar, Moscow, 121205 Russia

²Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: agafonovaluba@mail.ru

In this study, a substantiated selection of a substrate for further use in electrochemical enzyme immunoassay is carried out based on the parameters describing the enzymatic kinetics and the electrochemical characteristics of the products of electroenzymatic reactions. Data from an analysis of the electrochemical characteristics of screen-printed graphite electrodes (SPE) using various surface pretreatments are presented. Using SPE pretreatment in sulfuric acid, it was possible to achieve a significant decrease in the background current and lower the detection limit of 1-naphthol, which is a product of the enzymatic reaction catalyzed by alkaline phosphatase, to 0.73 μM in the differential pulse voltammetry (DPV) mode and to 0.09 μM in the chronoamperometry (CA) mode without the use of additional catalysts. The selected substrate and pretreatment were used in a quantitative electrochemical enzyme-linked assay for the determination of procalcitonin (PCT). The sensitivity coefficient and detection limit were 109 $\text{nA}\times\text{mL}/\text{mg}$ and 0.8 ng/mL , respectively.

Key words: immunosensors; electrochemical enzyme immunoassay; alkaline phosphatase substrates; electrochemical pretreatment

FUNDING

The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021-2030) №122030100168-2.

Received: 04.06.2025, revised: 14.10.2025, accepted: 07.11.2025