

ELEKTROCHEMICKÉ STANOVENÍ AKTIVITY ACETYLCHOLINESTERASY IMOBILIZOVANÉ NA POVRCHU MAGNETICKÝCH ČÁSTIC

Adam Kostelník¹, Alexander Čegan¹ a Miroslav Pohanka²

¹*Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita
Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice*

²*Katedra molekulární patologie a biologie, Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita
obrany, Třebešská 1575, 500 01 Hradec Králové*

Abstract

Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme which terminates action of neurotransmitter acetylcholine in cholinergic neurons. Activity of enzyme is commonly assayed by Ellman's method which has broad number of disadvantages like instability of reagents and used enzyme cannot be use repeatedly. Hence, we immobilized AChE onto surface of magnetic particles, which handle these drawbacks. To determinate activity of enzyme, square wave voltammetry (SWV) method was optimized, where screen-printed sensor with Prussian blue (PB) modified working electrode was used. Calibration curve for AChE inhibitor tacrine was performed. Also interference of organic solvents to AChE was tested.

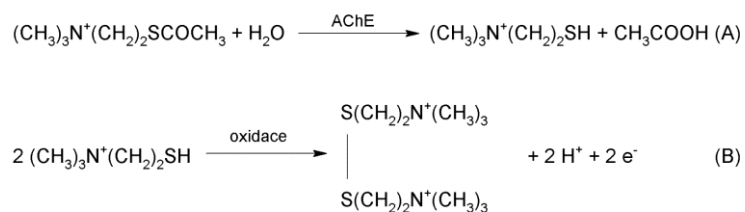
Souhrn

Acetylcholinesterasa (AChE) je enzym, který ukončuje přenos vzruchů v cholinergním systému. Jeho aktivita je nejčastěji vyšetřována Ellmanovou metodou, která ovšem používá nestabilních reagensů a rovněž použitý enzym nelze znovu využít. Proto byla AChE imobilizována na povrch magnetických částic, které řeší tyto nevýhody. Pro stanovení enzymové aktivity byla optimalizována metoda square wave voltametrie (SWV) za použití sítotiskových elektrod modifikovaných Pruskou modří. Rovněž byla sestrojena kalibrační závislost takrinu, jako modelového inhibitoru AChE, a stanoven vliv organických rozpouštědel na aktivitu AChE.

1. Úvod

AChE je enzym terminující přenos vzruchů v cholinergním systému, hydrolýzou acetylcholinu na cholin a kyselinu octovou [1]. V roce 1961 George L. Ellman představil kolorimetrickou metodu pro vyšetřování aktivity AChE. Tato metoda je založena na enzymové hydrolýze acetylthiocholinu (ATChCl) na thiocholin a kyselinu octovou. V následujícím kroku thiocholin reaguje s Ellmanovým činidlem 5,5'- dithiobis(2-nitrobenzoovou kyselinou) (DTNB) za vzniku žluté 5-thio-2-nitrobenzoové kyseliny, která je spektrofotometricky měřitelná při 412 nm [2]. Z důvodu světelné nestability DTNB lze

s výhodou využít elektrochemických metod [3]. V tomto případě je vznikající thiocholin elektrochemicky oxidován za vzniku disulfidického můstku a volných elektronů (obr. 1).



Obr. 1 Enzymová hydrolýza acetylthiocholinu (A), oxidace thiocholinu (B)

Sítotiskové elektrody jsou díky nízké ceně ideální pro masovou produkci, navíc mají dobrou reprodukovatelnost a spolehlivost. Jako materiálu se typicky využívá stříbrné či uhlíkové pasty. Široce používaná je uhlíková pasta, která je relativně levná, chemicky inertní a snadno se modifikuje. Do pasty lze přidávat bezpočet modifikátorů pro modifikaci elektrodového povrchu [4-6]. Thio- skupina podléhá elektrochemické oxidaci při relativně vysokém potenciálu (0,7 V). Přidáním modifikátoru, jako je ftalocyanin kobaltu, Pruská modř, CdS kvantové tečky nebo hexakyanoželezitan kobaltnatý, lze tento potenciál snížit [7,8]. Pruská modř byla použita pro katodickou redukci H_2O_2 , ovšem byly popsány i další aplikace pro stanovení kyseliny askorbové, hydrazinu a thiolů jako cystein, N-acetylcystein, glutation nebo thiocholin [9,10].

Magnetické částice prokázaly svou využitelnost např. v imobilizaci enzymů, imunologických stanoveních, DNA či RNA purifikaci a mnohých dalších aplikacích. [11-13]. Nicméně pouze několik prací se zabývalo imobilizací AChE na magnetické částice [14-17], ačkoliv existuje řada prací využívající AChE jako biosenzoru [18,19].

Cílem práce bylo imobilizovat AChE na povrch magnetických částic za použití EDC, který má schopnost tvořit amidové vazby ve vodném prostředí [20], optimalizovat SWV metodu za použití sítotiskových elektrod modifikovaných Pruskou modří ke sledování aktivity AChE v a bez přítomnosti takrinu a stanovení vlivu organických rozpouštědel na aktivitu AChE.

2. Experimentální část

2.1. Chemikálie

Acetylcholinesterasa z elektrického úhoře, lyofilizát (≥ 1000 units/mg protein), ATChCl, magnetické částice s vázanou karboxy skupinou, EDC, 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroakridin

hydrochlorid hydrát (takrin), N-acetyl-L-cystein, Pruská modř, fosfátový pufr (PBS) pH 7,4, dimethylsulfoxid (DMSO), Tween-20 a isopropyl alkohol byly dodány firmou Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), denaturovaný ethanol od firmy PENTA (Praha).

2.2. Přístroje a zařízení

Sítotiskové elektrody (BVT, Brno) o rozměrech 25,4 × 7,26 × 0,63 mm s kruhovou uhlíkovou pracovní elektrodou o průměru 1 mm, kruhovou platinovou pomocnou elektrodou a kruhovou chloridostříbrnou referentní elektrodou. Analýza byla prováděna na elektrochemickém analyzátoru PalmSens (PalmSens BV, Houten, Nizozemsko) komunikující s počítačem přes software PSLite 1,8 (PalmSens BV, Houten, Nizozemsko).

2.3. Podmínky SWV

Tab. 1 Podmínky square wave voltametrie

Rozsah potenciálu	0 – 1,8 V
Potenciálový krok	0,005 V
Amplituda	0,010 V
Frekvence	1 Hz

2.4. Příprava elektrod modifikovaných Pruskou modří

Navážka 3 mg Pruské modří byla rozpuštěna v 1 ml PBS 7,4 a důkladně zamíchána. Následně bylo na povrch elektrody nanášeno 30 µl roztoku a elektroda se nechala uschnout při laboratorní teplotě.

2.5. Příprava roztoků

Byly připraveny roztoky ATChCl a N-acetyl-L-cysteinu o koncentracích 75, 100, 125, 150, 175 a 200 mM a kalibrační roztoky takrinu v koncentracích 400, 500, 600, 700 a 750 µM. Všechny roztoky byly připraveny v objemu 1 ml ředěním PBS pH 7,4 do mikrozkušavek.

2.6. Příprava magnetických částic s imobilizovanou AChE (MPs-AChE)

Magnetické částice (400 µl) byly 2× promyty 1 ml PBS 7,4 a promývací pufr byl vždy zcela odpipetován. Následně bylo přidáno 200 µl EDC (3 mg ve 200 µl PBS 7,4). Tato směs byla 15 min třepána (600 rpm) a následně 2× promyta PBS 7,4. Pufr byl zcela odstraněn a bylo přidáno 300 µl PBS 7,4 a 300 µl AChE a směs byla třepána 2 hod (600 rpm). Nakonec

byly magnetické částice 3x promyty PBS 7,4 z důvodu odstranění nenavázaného enzymu, resuspendovány v 200 μ l PBS 7,4 a skladovány při 4 $^{\circ}$ C.

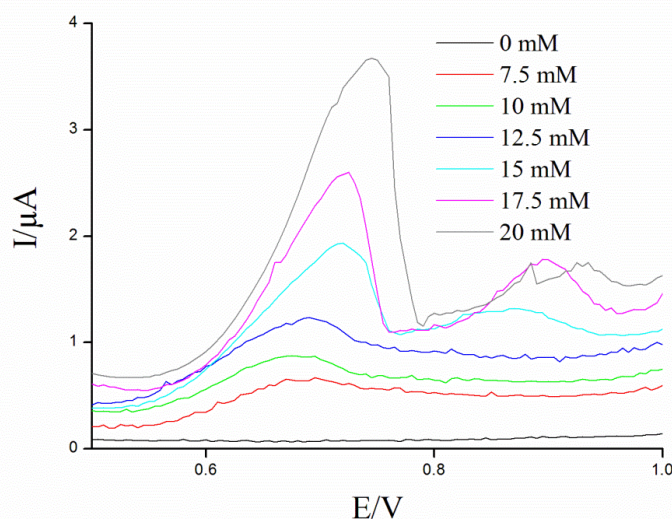
2.7. Voltametrické měření

400 μ l PBS 7,4, 25 μ l MPs-AChE, 25 μ l takrinu, 450 μ l PBS 7,4 a 100 μ l ATChCl o koncentraci 175 mM bylo přidáno do kyvety. Po 1 hod inkubace byl roztok odpipetován od magnetických částic do čisté kyvety. Následovalo voltametrické měření se sítotiskovou elektrodou modifikovanou Pruskou modří.

3. Výsledky a diskuse

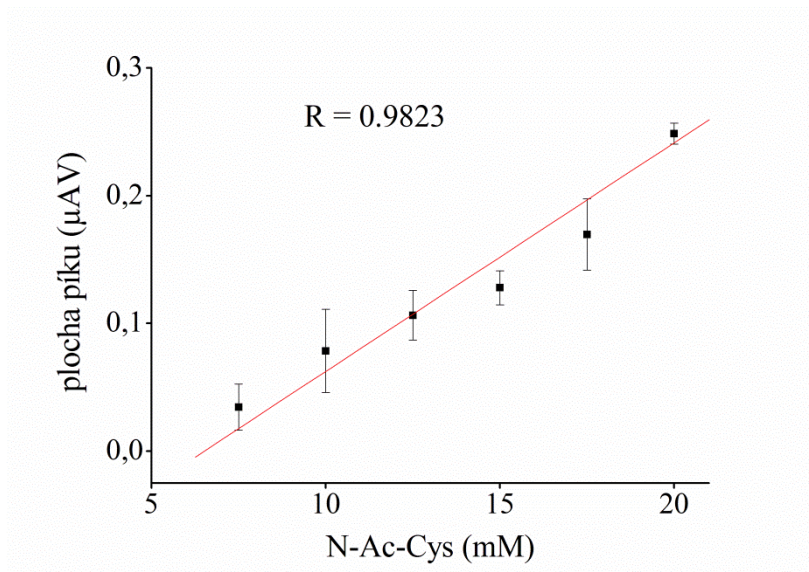
3.1. Optimalizace SWV metody

SWV metoda byla optimalizovaná za použití N-acetyl-L-cysteinu v rozmezí koncentrací 7,5 - 20 mM a pík thiocholinu byl získán při potenciálu přibližně 0,9 V a to v případě nemodifikované elektrody, zatímco měřením s modifikovanou elektrodou byl pík N-acetyl-L-cysteinu získán při potenciálu $0,745 \pm 0,005$ V (obr. 2, obr. 3). Podobných výsledků bylo dosaženo v práci Pohanky a kol. při měření glutationu, kdy byl pík thio skupiny získán při potenciálu $0,764 \pm 0,041$ V a v práci Foroughi a kol. při měření N-acetyl-L-cysteinu, který dostal pík při potenciálu 0,6 V [21,22]. Ve voltamogramu se mohou rovněž objevit vyšší oxidační stavy thio skupiny [23]. Jak již bylo popsáno dříve, Pruská modř má schopnost snižovat potenciál potřebný k oxidaci thio skupiny, což se nám podařilo prokázat během měření



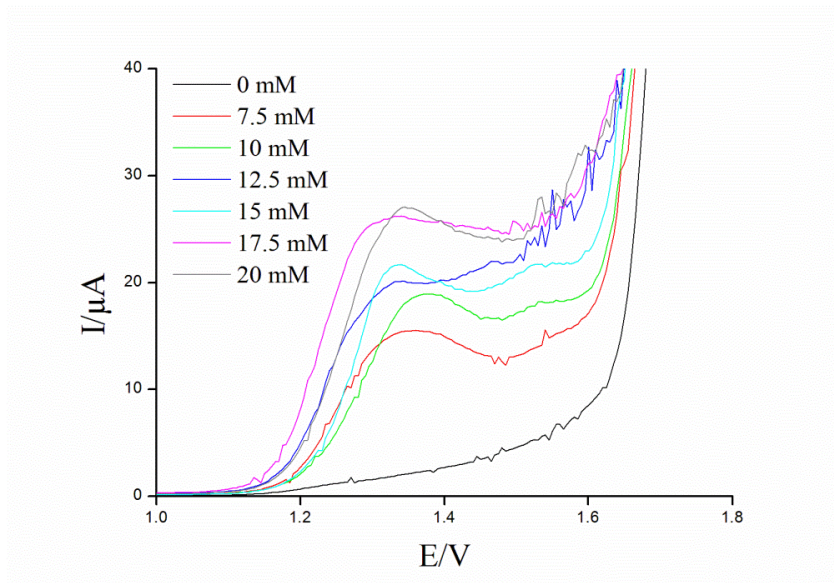
Obr. 2 SWV křivky N-acetyl-L-cysteinu v PBS 7.4

rozsah potenciálu 0 – 1.8 V, potenciálový krok 0.005 V, amplituda 0.010 V a frekvence 1 Hz; sítotisková elektroda uhlíková pracovní elektroda, AgCl referentní elektroda a platinová pomocná elektroda



Obr. 3 Optimalizační křivka N-acetyl-L-cysteinu v PBS 7.4

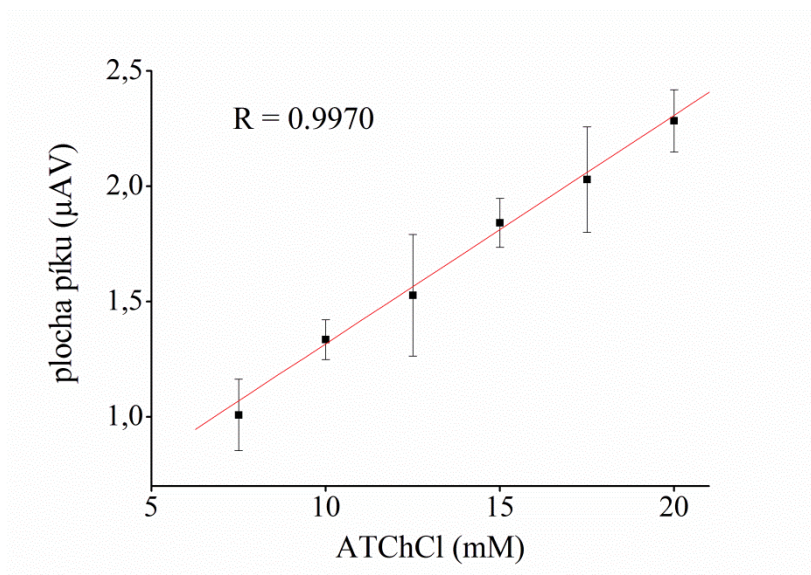
rozsah potenciálu 0 – 1.8 V, potenciálový krok 0.005 V, amplituda 0.010 V a frekvence 1 Hz; sítotisková elektroda uhlíková pracovní elektroda, AgCl referentní elektroda a platinová pomocná elektroda



Obr. 4 SWV křivky ATChCl v PBS 7.4

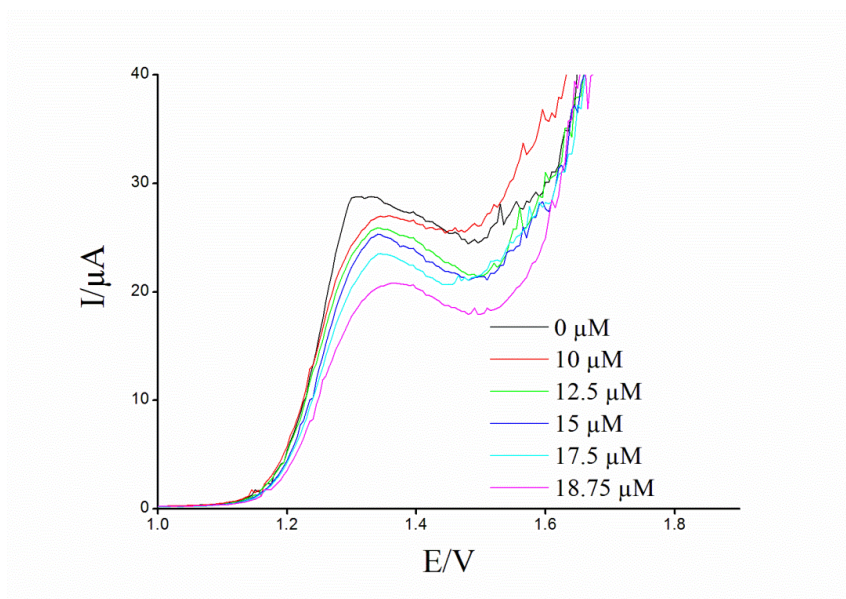
rozsah potenciálu 0 – 1.8 V, potenciálový krok 0.005 V, amplituda 0.010 V a frekvence 1 Hz; sítotisková elektroda uhlíková pracovní elektroda, AgCl referentní elektroda a platinová pomocná elektroda

N-acetyl-L-cysteinu [24]. Pro identifikaci píku thiocholinu byla sestrojena optimalizační křivka v rozmezí koncentrací 7,5 - 20 mM ATChCl (obr. 4, obr. 5). Ačkoli mají ATChCl a N-acetyl-L-cystein strukturní podobnost, pík thiocholinu byl nalezen při potenciálu $1,320 \pm 0,020$ V, což bohužel prodlužuje délku analýzy.



Obr. 5 Optimalizační křivka ATChCl v PBS 7.4

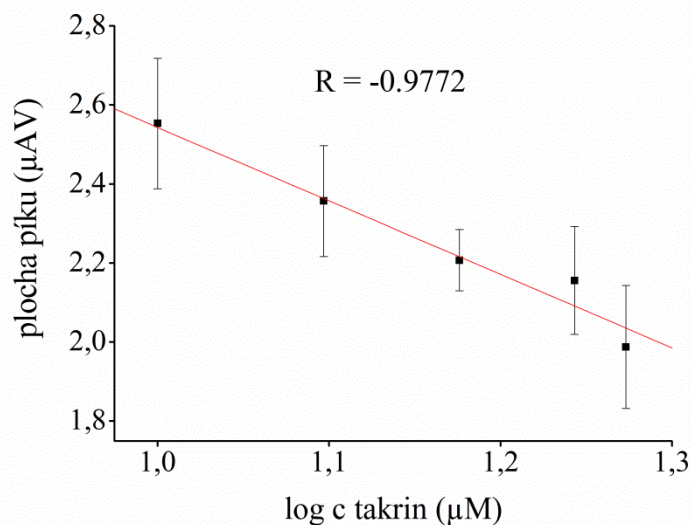
rozsah potenciálu 0 – 1.8 V, potenciálový krok 0.005 V, amplituda 0.010 V a frekvence 1 Hz; sítotisková elektroda uhlíková pracovní elektroda, AgCl referentní elektroda a platinová pomocná elektroda



Obr. 6 SWV křivky takrinu v PBS 7.4

rozsah potenciálu 0 – 1.8 V, potenciálový krok 0.005 V, amplituda 0.010 V a frekvence 1 Hz; sítotisková elektroda uhlíková pracovní elektroda, AgCl referentní elektroda a platinová pomocná elektroda

Takrin, reverzibilní inhibitor AChE, byl vybrán jako modelová molekula [25]. Byla sestrojena kalibrační křivka v rozmezí koncentrací 10 – 18,75 µM (obr. 6, obr. 7). Koncentrace takrinu nad 20 µM vracejí odezvu zpět do vyšších proudových hodnot a další inhibice již není pozorována. To je způsobeno saturací enzymu inhibitorem. Limit detekce pro



Obr. 7 Kalibrační křivka takrinu v PBS 7.4

rozsah potenciálu 0 – 1.8 V, potenciálový krok 0.005 V, amplituda 0.010 V a frekvence 1 Hz; sítotisková elektroda uhlíková pracovní elektroda, AgCl referentní elektroda a platinová pomocná elektroda

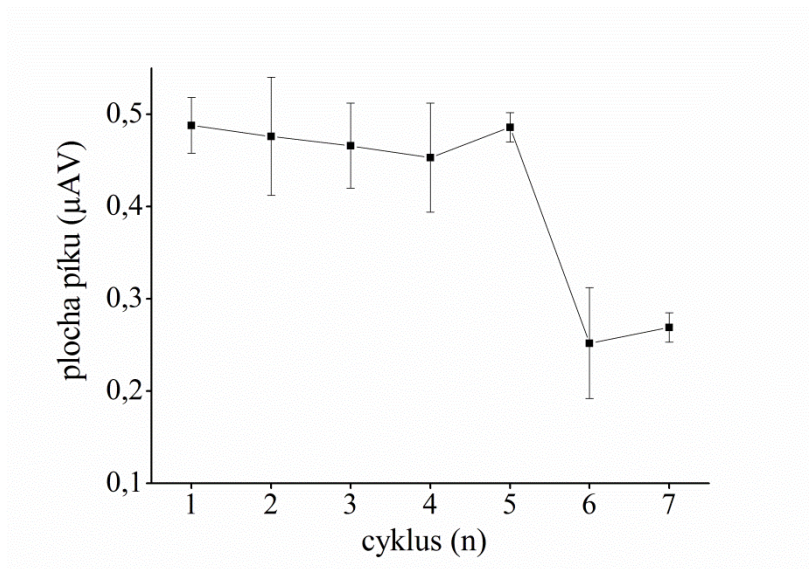
naši metodu byl vypočítán na 8,1 µM takrinu, podobných výsledků dosáhnul Bollo et al., který stanovil limit detekce na 4,8 µM takrinu [26].

3.2. Opakovatelnost měření s MPs-AChE

Cílem práce bylo připravit MPs-AChE pro opakované použití. Proto bylo testováno jak dlouho MPs-AChE vydrží bez poklesu enzymové aktivity, a to v případě, že nebude přítomen inhibitor (obr. 8). Pokles aktivity je způsoben degradací magnetických částic během promývání mezi jednotlivými cykly. Produkt degradace se objevoval jako hnědočervené zbarvení roztoku.

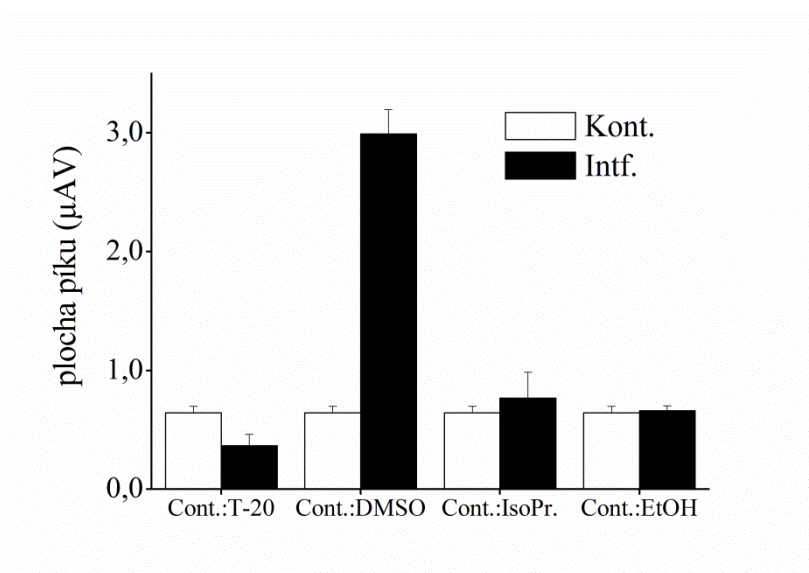
3.3. Vliv organických rozpouštědel na AChE

Byl stanoven vliv organických rozpouštědel na AChE za použití Tween-20 (0,025%), DMSO (2,5%), isopropyl alkoholu (2,5%) a ethanolu (5%). Tween-20 snižoval aktivitu AChE, ačkoliv žádná inhibice nebyla dříve pozorována [27,28]. Na druhou DMSO má schopnost inhibice AChE, nicméně v záznamu silně interferoval, důvodem je pravděpodobně oxidace na elektrodě [29,30]. Ethanol a isopropyl alkohol jsou schopny snižovat aktivitu AChE [31,32]. V námi použitých koncentracích nebyla aktivita AChE ovlivněna, nicméně nad 5 % způsobovali oba alkoholy ve voltamogramu šum a posun. Vyšší koncentrace isopropyl alkoholu navíc způsobovaly degradaci magnetických částic, u ethanolu toto pozorováno nebylo (obr. 9).



Obr. 8 Opakovatelnost měření s MPs-AChE v PBS 7.4

rozsah potenciálu 0 – 1.8 V, potenciálový krok 0.005 V, amplituda 0.010 V a frekvence 1 Hz; sítotisková elektroda uhlíková pracovní elektroda, AgCl referentní elektroda a platinová pomocná elektroda



Obr. 9 Vliv organických rozpouštědel na AChE

T-20 - Tween-20; DMSO - dimethylsulfoxid; IsoPr - isopropyl alkohol; EtOH - ethanol; Kont. - kontrola; Intf. - testované rozpouštědlo; rozsah potenciálu 0 – 1.8 V, potenciálový krok 0.005 V, amplituda 0.010 V a frekvence 1 Hz; sítotisková elektroda uhlíková pracovní elektroda, AgCl referentní elektroda a platinová pomocná elektroda

4. Závěr

AChE byla imobilizována na povrch magnetických částic za použití EDC a optimalizována pro použití se square wave voltametrií. Metoda je vhodná pro stanovení inhibitoru takrinu do 20 µM, nad tuto koncentraci již není pozorována další inhibice vlivem saturace enzymu. Limit detekce byl stanoven na 8,1 µM takrinu. Ethanol a isopropyl alkohol v použitých koncentracích neovlivňují aktivitu AChE, zatímco Tween-20 se ukázal být jako

inhibitor a DMSO v záznamu silně interferoval z důvodu oxidace na elektrodě. Zde prezentované výsledky byly publikovány v odborném periodiku [33].

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory Dlouhodobého výzkumného záměru č. 1011 (Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany). Tato práce byla podpořena grantem SGSFCHT_2016_004.

Literatura

1. Pohanka M.: *Biomedical Papers* **155** (2011) 219-223.
2. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. jr., Featherstone R.M.: *Biochem. Pharmacol.* **7** (1961) 88-95.
3. Walmsley T.A., Abernethy M.H., Fitzgerald H.P.: *Clin. Chem.* **33** (1987) 1928-1931.
4. Taleat Z., Khoshroo A., Mazloun-Ardakani M.: *Microchim. Acta* **181** (2014) 865-891.
5. Couto R.A.S., Lima J.L.F.C., Quinaz M.B.: *Talanta* **146** (2016) 801-814.
6. Metters J.P., Kadara R.O., Banks C. E.: *Analyst* **136** (2011) 1067-1076.
7. Rotariu L., Zamfir L.-G., Bala C.: *Sensor. Actuator. B Chem.* **150** (2010) 73-79.
8. Liu G., Riechers S.L., Mellen M.C., Lin Y.: *Electrochem. Comm.* **7** (2005) 1163-1169.
9. Suprun E., Evtugyn G., Budnikov H., Ricci F., Moscone D., Palleschi G.: *Anal. Bioanal. Chem.* **383** (2005) 597-604.
10. Ricci F., Palleschi G.: *Biosens. Bioelectron.* **21** (2005) 389-407.
11. Gijis M.A.M., Lacharme F.D.R., Lehmann U.: *Chem. Rev.* **110** (2009) 1518-1563.
12. Liu X., Guan Y., Ma Z., Liu H.: *Langmuir* **20** (2004) 10278-10282.
13. Martinkova P., Pohanka M.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **10** (2015) 7033-7048.
14. Istamboulie G., Andreescu S., Marty J.-L., Noguier T.: *Biosens..Bioelectron.* **23** (2007) 506-512.
15. Günther A., Bilitewski U.: *Anal. Chim. Acta* **300** (1995) 117-125.
16. Gan N., Yang X., Xie D., Wu Y., Wen W.: *Sensors* **10** (2010) 625-638.
17. Lui J., Günther A., Bilitewski U.: *Environment. Monit. Assess.* **44** (1997) 375-382.
18. Chen D., Jiao Y., Jia H., Guo Y., Sun X., Wang X., Xu J.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **10** (2015) 10491-10501.
19. Xia N., Gao Y.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **10** (2015) 713-724.

20. Seno K., Matumura K., Oshima M., Motomizu S.: *Anal. Sci.* **24** (2008) 505-508.
21. Pohanka M., Bandouchova H., Sobotka J., Sedlackova J., Soukupova I., Pikula J.: *Sensors* **9** (2009) 9094-9103.
22. Foroughi M.M., Beitollahi H., Tajik S., Akbari A., Hosseinzadeh R.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **9** (2014) 8407-8421.
23. Kracmarova A., Pohanka M.: *Chemicke Listy* **108** (2014) 64-68.
24. Ricci F., Arduini F., Amine A., Moscone D., Palleschi G.: *J. Electroanal. Chem.* **563** (2004) 229-237.
25. Davis K. L., Powchick P.: *Lancet* **345** (1995) 625-630.
26. Bollo S., Muñoz L., Núñez-Vergara L.J., Squella J.A.: *Electroanalysis* **12** (2000) 376-382.
27. Singh A.K., Flounders A.W., Volponi J.V., Ashley C.S., Wally K., Schoeniger J.S.: *Biosens. Bioelectron.* **14** (1999) 703-713.
28. Li B., Stribley J.A., Ticu A., Xie W., Schopfer L.M, Hammond P., Brimijoin S., Hinrichs S.H., Lockridge O.: *J. Neurochem.* **75** (2000) 1320-1331.
29. Montesinos T., Pérez-Munguía S., Valdez F., Marty J.-L.: *Anal. Chim. Acta* **431** (2001) 231-237.
30. Solná R., Sapelnikova S., Skládal P., Winther-Nielsen M., Carlsson C., Emnéus J., Ruzgas T.: *Talanta* **65** (2005) 349-357.
31. Husain K., Somani S.M.: *Progr. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatr.*, **21** (1997) 659-670.
32. Obregon A.D.C., Schetinger M.C.R., Correa M.M., Morsch V.M., da Silva J.E.P., Martins M.P.A., Bonacorso H.G., Zanatta N.: *Neurochem. Res.* **30** (2005) 379-384.
33. Kostelnik A., Cegan A., Pohanka M.: *Int. J. Electrochem. Sci.* **11** (2016) 4840-4849.