

DETERMINAZIONE DELLA FOSFOCOLINA MEDIANTE BIOSENSORE A COLINA OSSIDASI/FOSFATASI ALCALINA IMMOBILIZZATI

R. Ciriello e A. Guerrieri

Dipartimento di Chimica, Università degli Studi della Basilicata, Via N. Sauro, 85 - 85100 Potenza (antonio.guerrieri@unibas.it)

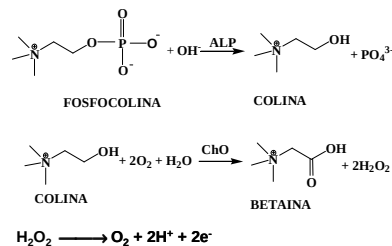
INTRODUZIONE

La fosfocolina (PCh), metabolita idrosolubile della colina (Ch) e precursore di un importante componente delle membrane cellulari quali la fosfatidilcolina (PtCh), è coinvolta nella regolazione della mitogenesi e della carcinogenesi [1]. Tessuti affetti da forme tumorali di natura maligna sembrano infatti contenere, rispetto ai tessuti normali, livelli di PCh decisamente più elevati [2]. La determinazione dei livelli di PCh è importante anche nel caso di patologie neurodegenerative quali il morbo di Alzheimer per le quali si riscontrano livelli elevati dei metaboliti correlati alla PtCh nel fluido cerebrospinale [3].

Le metodologie convenzionali per la determinazione della PCh in campioni biologici sono complesse e spesso richiedono strumentazioni particolari il che preclude la possibilità di analisi di routine nei comuni laboratori. Sono state messe a punto metodiche che sfruttano la GC-MS previa derivatizzazione dell'analita [4], l'HPLC con rivelatore elettrochimico accoppiata ad una colonna ad enzima immobilizzato [5], metodi radioenzimatici [6], la spettroscopia NMR multinucleare [7] o ancora tecniche del tipo imaging TOF-SIMS [8]. In questo contesto i biosensori amperometrici risultano piuttosto promettenti essendo caratterizzati da bassi costi di utilizzo e facilità di impiego.

Nel presente lavoro di ricerca è stato realizzato un sensore amperometrico bienzimatico per il dosaggio della PCh basato sulla co-immobilizzazione della fosfatasi alcalina (ALP) e della colina ossidasi (ChO) su un elettrodo di platino mediante la tecnica del co-crosslinking enzimatico [9-11]. Essendo l'ALP non specifica nei confronti dell'idrolisi della PCh si è reso necessario uno studio preliminare sulle prestazioni del biosensore al variare della fonte di tale enzima. È stato investigato poi l'effetto di altri parametri sperimentali quali il rapporto in termini di attività tra ALP e ChO nella soluzione di immobilizzazione nonché la composizione e il pH del tampone sul responso del biosensore alla PCh. Tra tutti i dispositivi realizzati, il biosensore che ha evidenziato le migliori performances analitiche è stato applicato all'analisi in flusso in prospettiva di un futuro impiego per la determinazione della PCh in campioni di interesse clinico diagnostico quali fluido cerebrospinale o omogeneizzati di tessuti. A tale scopo si è combinato il co-crosslinking enzimatico all'elettrosintesi di un film permselectivo sulla superficie elettrodica in grado di ovviare alle comuni problematiche di avvelenamento dell'elettrodo ed interferenza faradica.

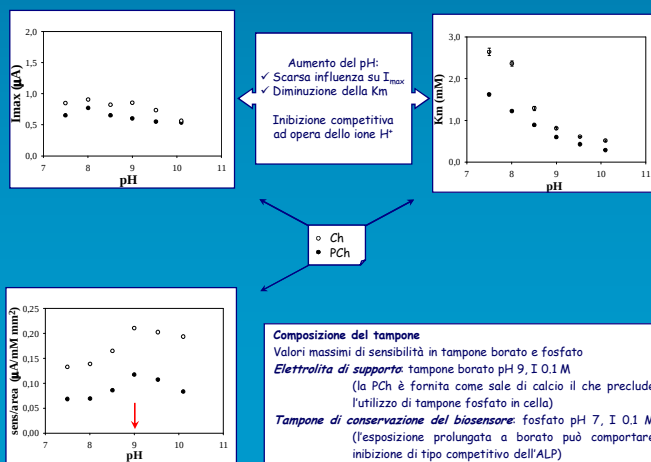
Principio di funzionamento del biosensore



Parametri cinetici ed analitici del biosensore al variare della fonte di ALP e del rapporto di attività ALP/ChO

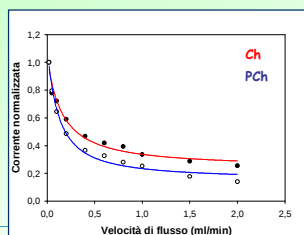
ALP	Rapporto ALP/ChO nella soluzione di immobilizzazione	Substrato	I_{max} (μA)	K_m (mM)	Sens/area ($\mu\text{A}/\text{mM} \cdot \text{mm}^2$)	Rapporto di intensità Ch/PCh
da mucosa intestinale bovina 13 unità DEA/mg 1g di liofilizzato	13U/14U (1 mg : 1 mg)	Ch	0.388 ± 0.002	0.222 ± 0.005	0.2 ± 0.2	15
		PCh	0.158 ± 0.043	23.0 ± 1.2	0.0132 ± 0.0001	
	130U/14U (10 mg : 1 mg)	Ch	0.010 ± 0.001	0.233 ± 0.005	0.09 ± 0.03	7.5
		PCh	0.0840 ± 0.0008	0.72 ± 0.03	0.012 ± 0.001	
da mucosa intestinale bovina 18311 unità/ml 1 ml di soluzione	159U/14U (10 μl : 1 mg)	Ch	1.169 ± 0.007	0.145 ± 0.005	1.1 ± 0.2	86
		PCh	0.491 ± 0.008	6.1 ± 0.3	0.0134 ± 0.0003	
	796U/14U (50 μl : 1 mg)	Ch	1.61 ± 0.03	0.17 ± 0.01	1.48 ± 0.09	7.0
		PCh	1.43 ± 0.02	1.43 ± 0.06	0.211 ± 0.006	
da gambero 1300 unità DEA 0.4 ml di soluzione	1592U/14U (100 μl : 1 mg)	Ch	5.9 ± 0.3	0.56 ± 0.08	1.93 ± 0.03	5.0
		PCh	3.5 ± 0.2	1.4 ± 0.2	0.38 ± 0.02	
	130U/14U (100 μl : 1 mg)	Ch	1.91 ± 0.03	0.19 ± 0.01	1.6 ± 0.2	37
		PCh	0.90 ± 0.06	6.5 ± 0.8	0.04 ± 0.03	
da intestino di vitellino 2000 unità DEA 0.015 ml di soluzione	133U/14U (1 μl : 1 mg)	Ch	1.19 ± 0.02	0.120 ± 0.006	1.2 ± 0.2	15
		PCh	0.51 ± 0.01	1.5 ± 0.1	0.080 ± 0.006	
	266U/14U (2 μl : 1 mg)	Ch	2.05 ± 0.01	0.103 ± 0.003	2.8 ± 0.3	58.3
		PCh	0.94 ± 0.02	5.4 ± 0.2	0.048 ± 0.002	

Influenza della composizione e del pH del tampone



APPLICAZIONE DEL BIOSENSORE ALL'ANALISI IN FLUSSO

Influenza della velocità di flusso

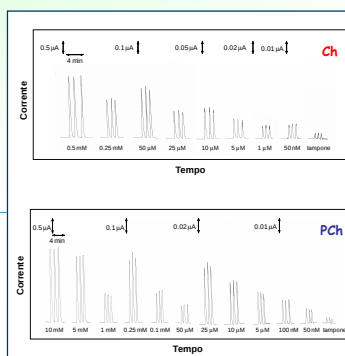


Responso normalizzato del biosensore Pt/ALP-ChO relativo all'iniezione di una soluzione standard di Ch 0.05 mM e PCh 0.05 mM in funzione della velocità di flusso. Elettrolita di supporto: tampone borato pH 9.0, I 0.1 M, volume di iniezione 20 μl ; potenziale di rivelazione: +0.7 V vs. Ag/AgCl.

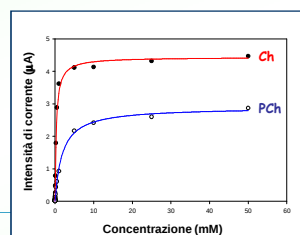
Diminuzione del segnale di corrente all'aumentare della velocità di flusso:
→ il comportamento analitico del biosensore è controllato dalla catalisi degli enzimi immobilizzati in membrana

Velocità di flusso ottimale 0.2 mL/min
• responsi elevati
• sufficiente numero di analisi per unità di tempo

Performances analitiche del biosensore



Iniezioni in flusso su elettrodo Pt/ALP-ChO di soluzioni standard di Ch e PCh. Velocità di Flusso 0.2 mL/min; elettrolita di supporto tampone borato pH 9.0, I 0.1 M; volume di iniezione 20 μl ; potenziale di rivelazione: +0.7 V vs. Ag/AgCl.



Ch
Intervallo lineare: fino a circa 0.050 mM
Sensibilità assoluta = $9.27 \mu\text{A}/\text{mM}$
Sensibilità/area = $1.31 \mu\text{A}/(\text{mM} \times \text{mm}^2)$
Limite di rivelabilità = 50 nM (S/N = 3)

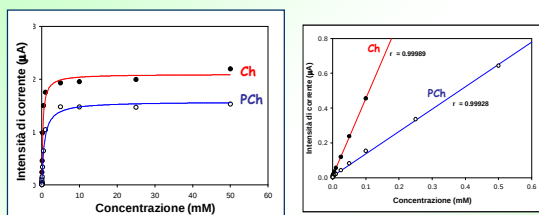
Ch
 $I_{\text{max}} = 4.43 \pm 0.07 \mu\text{A}$
 $K_m = 0.33 \pm 0.02 \text{ mM}$

PCh
 $I_{\text{max}} = 2.90 \pm 0.04 \mu\text{A}$
 $K_m = 1.9 \pm 0.1 \text{ mM}$

PCh
Intervallo lineare: fino a circa 0.25 mM
Sensibilità assoluta = $1.64 \mu\text{A}/\text{mM}$
Sensibilità/area = $0.23 \mu\text{A}/(\text{mM} \times \text{mm}^2)$
Limite di rivelabilità = 100 nM (S/N = 3)

Rapporto di sensibilità Ch/PCh = 5

Caratterizzazione del biosensore Pt/PPy_{ox}/ALP-ChO



- La presenza del rivestimento polimerico determina un intervallo di linearità più esteso e pur comportando, come da attendersi, una certa attenuazione dei valori di sensibilità (Ch: $4.46 \mu\text{A}/\text{mM}$, L.o.D 100 nM (S/N=3); PCh: $1.28 \mu\text{A}/\text{mM}$, L.o.D 500 nM (S/N=3)), non preclude certo l'applicazione del sensore all'analisi di PCh in campioni reali. I livelli di PCh in campioni biologici, quali ad esempio intorno a 0.5 mM nelle cellule mammarie [7] e 1.28 μM nel fluido cerebrospinale [3] con tendenza in entrambi i casi ad aumentare in presenza di patologie varie.
- La capacità della membrana di PPy_{ox} a rigettare in modo efficiente sostanze interferenti presenti in campioni biologici, quali ascorbato e cisteina, è stata ampiamente dimostrata in lavori precedenti [11, 12] ed è stata confermata nel caso del presente biosensore.

CONCLUSIONI

Nel presente lavoro di ricerca è stato messo a punto un biosensore amperometrico per l'analisi della PCh basato sulla co-immobilizzazione di ALP e ChO mediante co-crosslinking sulla superficie di un elettrodo di platino usato come rivelatore amperometrico in flusso. L'ottimizzazione di parametri sperimentali quali la fonte di ALP, il rapporto ALP/ChO immobilizzati, l'effetto del pH e la natura del tampone da utilizzare in analisi e per la conservazione del biosensore, hanno consentito la realizzazione di un dispositivo analitico le cui prestazioni in termini di linearità e limiti di rivelabilità sono risultate più che adeguate ad una futura applicazione all'analisi di campioni reali.

A tale scopo si è resa necessaria l'elettrosintesi di un film polimerico permselectivo quale il polipirrol ossidato sulla superficie dell'elettrodo di Pt prima della fase di immobilizzazione dei due enzimi. L'utilizzo di un rivelatore in flusso del tipo thin-layer a doppio elettrodo (configurazione parallela) [11], a ChO immobilizzata e a ChO/ALP co-immobilizzate, consentirà la simultanea determinazione di colina e fosfocolina senza la necessità di ricorrere ad uno step cromatografico tipicamente richiesto per separare tali due sostanze.

Riferimenti bibliografici

- [1] Z. Kiss Cellular Signalling 11 (1999) 149-157
- [2] Y. T. Ting, D. Sherr, H. Degani Anticancer Res 16 (1996) 1381-8
- [3] A. Walter, U. Korth, M. Hilgert, J. Hartmann, O. Weichel, M. Hilgert, K. Fassbender, A. Schmitt, J. Klein Neurology of Agins 25 (2004) 1299-1303
- [4] E. A. Pomfret, K. A. Da Costa, L. Schurman, S. H. Zeisel Analytical Biochemistry 180 (1989) 85-90
- [5] S. Murai, H. Saito, R. Shitao, T. Kawaguchi Journal of Pharmacological and Toxicological Methods 46 (2002) 103-109
- [6] J. Murray, T. Dinh, A. Thruett, D. Kenerly Biochemical Journal 270 (1990) 63-8
- [7] R. Katz-Brull, R. Margalit, P. Bendel, H. Degani Magnetic Resonance materials in Biology, Physics and medicine 6 (1998) 44-52
- [8] H. Nygren, K. Borner, B. Hagenhoff, P. Malmberg, J. E. Mansson Biochimica et Biophysica Acta 1737 (2005) 102-110
- [9] A. Guerrieri, G. E. De Benedetto, F. Palmisano, P. G. Zamboni The Analyst 120 (1995) 2731-2736
- [10] A. Guerrieri, F. Palmisano Analytical Chemistry 73 (2001) 2875-2882
- [11] A. Guerrieri, V. Lattanzio, F. Palmisano, P. G. Zamboni Biosensors and Bioelectronics 21 (2006) 1710-1718
- [12] D. Centonze, A. Guerrieri, C. Malatesta, F. Palmisano, P. G. Zamboni Fresenius J. Anal. Chem. 342 (1992) 729-733