

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра материаловедения, технологии
и управления качеством

**ВЛИЯНИЕ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА КОМПОНЕНТОВ
НА МОРФОЛОГИЮ И ПОТЕНЦИАЛ ПОВЕРХНОСТИ ГИБРИДНЫХ
СТРУКТУР**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы
направления 22.03.01 «Материаловедение и технологии материалов»
факультета нано- и биомедицинских технологий

Масленниковой Арины Алексеевны

Научный руководитель

доцент, к.ф.-м.н., доцент
должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

С.В. Стецюра
инициалы, фамилия

Консультант

инженер, к.ф.-м.н.
должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

А.В. Козловский
инициалы, фамилия

Зав. кафедрой

профессор, д.ф.-м.н.
должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

С.Б. Вениг
инициалы, фамилия

Саратов 2020

Введение. В настоящее время адсорбция молекул ферментов на различных поверхностях, в том числе полупроводниковых материалов, широко применяется в различных областях науки и техники при создании биосенсоров, биоматериалов, разделении белков, доставке лекарств и т.д. Поэтому она привлекает внимание многих исследователей и изучается как теоретическими [1], так и экспериментальными [2] методами для того, чтобы суметь понять, предсказать и проконтролировать процесс протекания и результат адсорбции молекул и формирования ферментного слоя.

Ключевым этапом разработки биосенсора является поддержание биоактивности фермента после его иммобилизации на твердой поверхности. Когда фермент адсорбируется с благоприятной ориентацией для протекания ферментативной реакции преобразователем, то обеспечивается высокая биокаталитическая активность фермента [3].

Существуют два основных принципа иммобилизации фермента на поверхности адсорбента – это химическое прикрепление и физическая адсорбция. Физическая адсорбция позволяет с помощью различных внешних воздействий (освещение, электрическое поле и т.д.) изменять количество, ориентацию и конформацию иммобилизованных молекул адсорбата. Благодаря химическому прикреплению обеспечивается стабильное закрепление фермента, но при этом может ухудшиться биологическая активность молекул белка.

Преыдушие экспериментальные данные по адсорбции фермента глюкозооксидазы (GOx) и результаты молекулярного моделирования других белков [1,2] показали, что адсорбцией можно управлять, изменяя механизм электростатического взаимодействия компонентов биосенсорной гибридной структуры. Увеличение концентрации фермента на поверхности при прочих равных условиях возможно благодаря использованию освещения из области поглощения Si во время иммобилизации фермента [4]. Данный механизм получил название фотостимулированной адсорбции (ФСА) полиэлектролитов. Повлиять на зарядовое состояние поверхности подложки можно не только освещением с длинами волн из спектра поглощения Si, но и за счет

использования катионного буферного слоя (например, полиэтиленimina – ПЭИ). На эффективный заряд GOx в водном растворе можно влиять, изменяя ионную силу этого раствора путем добавления неорганической хорошо растворимой соли.

Таким образом, *целью* бакалаврской работы является установление условий адсорбции молекул фермента GOx на полупроводниковый трансдьюсер, повышающих вероятность иммобилизации молекул фермента и плотность ферментного слоя с сохранением биокаталитической активности фермента.

Данная работа предусматривает выполнение следующих *задач*:

- провести обзор современной литературы о разнообразии применения и проблемах технологии ферментных биосенсоров, а также используемых методах и компонентах при создании ферментных слоёв биосенсорных структур;

- создать гибридные структуры типа $n\text{-Si/SiO}_2/\text{GOx}$ и $n\text{-Si/SiO}_2/\text{ПЭИ}/\text{GOx}$, варьируя условия освещения и ионную силу раствора, из которого будет осуществляться адсорбция молекул GOx и ПЭИ;

- определить электрический потенциал компонентов биосенсорной структуры при помощи анализатора Malvern Zetasizer Nano Series;

- определить размер органических молекул GOx и ПЭИ при помощи анализатора Malvern Zetasizer Nano Series;

- исследовать изменения в зависимости от условий получения топографии поверхности получившихся образцов методом атомно-силовой микроскопии с помощью установки ИНТЕГРА Спектра;

- исследовать изменения в зависимости от условий получения контактной разности потенциалов между зондом и поверхностью методом сканирующего зонда Кельвина с помощью установки ИНТЕГРА Спектра;

- исследовать топографию поверхности получившихся образцов и контактную разность потенциалов между зондом и поверхностью указанных гибридных структур при помощи инструментов анализа модульной программы для визуализации и анализа данных сканирующей зондовой микроскопии Gwyddion;

- провести компьютерную обработку данных, полученных методами атомно-силовой микроскопии и сканирующего зонда Кельвина на установке ИНТЕГРА Спектра при изучении поверхности гибридных структур типа n -Si/SiO₂/GOx и n -Si/SiO₂/ПЭИ/GOx;

- проанализировать результаты, разработать рекомендации по совершенствованию метода фотостимулированной адсорбции ферментов на полупроводниковую подложку;

- установить влияния освещения, ионной силы раствора и буферного слоя на поверхности n -Si на зарядовое состояние компонентов биосенсорной структуры и, соответственно, на эффективность электростатического механизма адсорбции молекул GOx.

Основное содержание работы

Основная часть работы содержит как обзор научной литературы по сформулированной выше проблеме, так и практическую часть, в которой представлены результаты выполнения поставленных задач.

Модификация технологических режимов создания гибридных структур. Для улучшения характеристик биосенсорных систем на основе полупроводникового трансдьюсера, использующих в качестве фермента глюкозооксидазу, был выбран путь разработки (модификации) условий адсорбции молекул GOx, не требующий серьёзных дополнительных материальных затрат и специального оборудования.

Поскольку механизм электростатического взаимодействия при адсорбции полиионных молекул из раствора является доминирующим, то было принято решение исследовать изменение электрического потенциала адсорбируемых молекул GOx в растворе за счет добавления соли NaCl и изменение электрического потенциала поверхности кремниевых подложек при их освещении и модификации наноразмерным буферным слоем. Фиксируя изменения электрического потенциала компонентов гибридной структуры и исследуя затем результаты адсорбции молекул GOx, можно сделать

предположения и разработать рекомендации по изменению условий адсорбции GOx для получения высокочувствительной биосенсорной структуры.

Технология создания органических слоев структур кремний-полиэтиленимин-глюкозооксидаза и характеристики используемых компонентов. В качестве полупроводникового преобразователя сигнала используется пластина монокристаллического кремния *n*-типа, на которую методом послойной адсорбции наносятся непосредственно или с буферным слоем полиэтиленимина молекулы GOx из водного раствора с разной концентрацией соли NaCl. Во время адсорбции часть образцов освещалась белым светом при помощи волоконного осветителя фирмы Schott с галогенной лампой, спектр излучения которой содержит длины волн из спектра поглощения Si (рисунок 1). Время освещения составляло 10 минут. Освещённость в центре светового пятна была примерно 20000 лк.

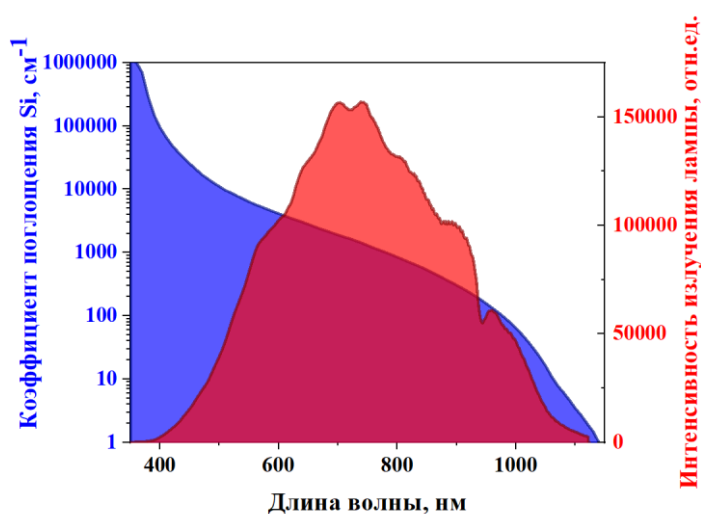


Рисунок 1 – Спектр поглощения кремния (синий) и спектр интенсивности излучения галогенной лампы (красный) [5]

В ходе эксперимента перед адсорбцией органических слоев кремниевые подложки обрабатывались в перекисно-аммиачном растворе $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}=1:1:4$ в течение 10 минут при температуре 75 °С. Такая обработка приводит к удалению органических загрязнений и активизации отрицательно заряженных ОН-групп на поверхности [6]. Затем образцы

промывались в деионизованной воде в течение 10 минут и сушились в потоке сухого азота.

Методы и режимы исследования органических компонентов в растворе и после иммобилизации на подложку. В работе изучался электрический потенциал компонентов биосенсорной структуры по отдельности – до момента иммобилизации и потенциал структуры $n\text{-Si/SiO}_2/\text{ПЭИ/GOx}$ «в сборке». Изменения потенциалов в различных условиях сопоставлялись с оценкой размеров, возможной агрегацией молекул в растворе и изменением рельефа поверхности кремниевой подложки с нанесенными органическими слоями. Определение электрокинетического ζ -потенциала и размера органических молекул проводилось на анализаторе Malvern Zetasizer Nano Series.

С помощью установки ИНТЕГРА Спектра, представляющей собой интеграцию атомно-силового микроскопа с конфокальной КР/флуоресцентной микроскопией и спектроскопией, отслеживалась топография поверхности исследуемых образцов методом атомно-силовой микроскопии, а также контактная разность потенциалов между зондом и поверхностью – методом сканирующего зонда Кельвина.

Заключение. В результате обзора современной литературы были получены следующие теоретические выводы:

1. В настоящее время ферментные биосенсоры широко используются в различных областях науки и техники. Отличительными свойствами таких устройств являются компактность, портативность, возможность многоразового использования, способность анализировать сложные соединения, высокая чувствительность и селективность, простота и удобство в эксплуатации;

2. Основные тенденции для оптимизации работы ферментных датчиков заключаются в уменьшении размеров конструкции, повышении надежности и чувствительности, стабильности и устойчивости к разрушающим действиям посторонних факторов, снижающих время службы биосенсорных систем, расширение диапазона анализируемых веществ, которые могут быть определены;

3. Приоритетным направлением в улучшении характеристик биосенсорных систем является возможность повышения чувствительности к аналиту из-за увеличения количества молекул в монослое фермента, а не за счёт дополнительных циклов иммобилизации и увеличения концентрации в растворе;

4. На данный момент в полной мере не объяснено поведение гибридной биосенсорной структуры при наличии биомолекул или изменений pH раствора, тем более в присутствии внешних воздействий, например, таких как освещение или электромагнитное поле. Поэтому проведение исследований в этом направлении представляется актуальным и перспективным.

В ходе выполнения практической части можно выделить следующие результаты:

1. Были получены партии образцов, представляющих собой слоистые гибридные структуры $n\text{-Si/SiO}_2/\text{GOx}$ и $n\text{-Si/SiO}_2/\text{ПЭИ}/\text{GOx}$, для использования в биосенсорике. Органические слои на кремниевую подложку наносились методом послойной адсорбции из раствора, при этом варьировалась ионная сила растворов полиэлектролитов (ПЭИ и GOx), а также ряд экспериментов проводился при дополнительной фотостимуляции полупроводниковой подложки во время адсорбции органических слоев;

2. Благодаря освещению произошла частичная компенсация отрицательного заряда поверхностных состояний на Si n -типа, что привело к увеличению адсорбции анионов GOx из водного раствора;

3. Изменение ионной силы ферментативного раствора также благоприятно влияет на результативность ФСА, вызывая перераспределение зарядов в молекулах GOx, что позволяет им закрепляться даже на отрицательно заряженных поверхностях, причем в ориентации наиболее благоприятной для протекания биохимической реакции;

4. Одновременное применение фотостимуляции кремниевой подложки во время адсорбции GOx и изменение ионной силы раствора с ферментами приводит к увеличению количества иммобилизованных молекул GOx в 50-80 раз на подложке $n\text{-Si}$ без буферного слоя и более чем в 4 раза на подложке $n\text{-Si}$

Si/SiO₂/GOx/ПЭИ. Наибольший эффект по сравнению с темновой адсорбцией из растворов с разной ионной силой достигается при освещении и концентрации NaCl, равной 0,1 моль/л.

В случае формирования буферного слоя ПЭИ нанесением из раствора, содержащего соль NaCl, были получены следующие положения:

1. Корреляция между изменением δN и $\delta \phi$ слабо выражена. То есть при незначительном изменении N после нанесения GOx значение ϕ может изменяться достаточно сильно. Это связано с морфологией поверхности (высокой шероховатостью и рельефностью подложки *n*-Si/SiO₂/ПЭИ в случае нанесения ПЭИ из раствора, содержащего соль NaCl). Сделан вывод о том, что в случае, когда ПЭИ наносили из раствора, содержащего соль NaCl, об иммобилизации GOx на поверхности подложки правильнее судить по значению $\delta \phi$, коррелирующему с числом осажденных молекул GOx;

2. Осаждение молекул фермента GOx на поверхность *n*-Si/SiO₂/ПЭИ приводит к уменьшению потенциала Кельвина. Однако на некоторых образцах изменение поверхностного потенциала после осаждения GOx «положительное», хотя и весьма незначительное по модулю. Это означает, что иммобилизация GOx на поверхности также незначительная, и при этом GOx адсорбируется своей отрицательно заряженной «лицевой» стороной на заряженную положительно поверхность *n*-Si/SiO₂/ПЭИ. Очевидно, что условия эксперимента в данном случае не благоприятны для создания высокочувствительного слоя GOx и сохранения биокаталитической активности молекул фермента;

3. Использование освещения во время иммобилизации органических слоёв способствует увеличению количества осаждаемых молекул GOx, но эффективность от фотостимуляции кремниевой подложки существенно падает при нанесении буферного слоя ПЭИ из раствора, содержащего соль NaCl, поскольку повышение ионной силы раствора приводит к более значительному росту значений средних высот неровностей N структуры *n*-Si/SiO₂/ПЭИ за счет конформационных изменений молекул ПЭИ в таком растворе (в следствии формирования полимерных клубков).

Таким образом, перераспределение зарядов в молекулах ГОх и частичная компенсация заряда на поверхности *n*-Si, вызванные освещением и изменением ионной силы раствора, позволили осуществить эффективную иммобилизацию анионного фермента на Si *n*-типа, причем эффективность от проведения фотостимуляции увеличивается при использовании раствора NaCl при иммобилизации слоя ГОх и уменьшается при нанесении слоя ПЭИ.

Полученные выводы могут быть полезны при разработке высокочувствительных биосенсорных ферментативных структур на основе Si, ПЭИ и ГОх.

Список использованных источников

1 Ratner, B. D. Biomolecules and surfaces / B. D. Ratner, D. G. Castner, T. A. Horbett, T. J. Lenk, K. B. Lewis, R. J. Rapoza // Journal of Vacuum Science and Technology. - 1990. - V. 8. - P. 2306-2317.

2 Xie, Y. Hamiltonian replica exchange simulations of glucose oxidase adsorption on charged surfaces / Y. Xie, Z. Li, J. Zhou // Physical Chemistry Chemical Physics. - 2018. - V. 20. - P. 14587-14596.

3 Kozlowski, A. V. Change in the surface density of immobilized enzyme molecules induced by photoelectron processes in a silicon substrate / A. V. Kozlowski, E. D. Kiseleva, A. A. Maslennikova, S. V. Stetsyura // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. - 2018. - V. 443. - P. 012016 (6 p.).

4 Maslennikova, A. A. The influence of illumination and ionic strength of a solution on the formation of biosensor structure based on a silicon substrate and glucose oxidase molecules / A. A. Maslennikova, A. V. Kozlowski, S. Santer, S. V. Stetsyura // Journal of Physics: Conference Series. - 2019. - V. 1400, № 7. - P. 077052 (6 p.).

5 Light Source Rugged AC halogen light source [Электронный ресурс] // Light Source Rugged AC halogen light source [Электронный ресурс] : [сайт]. - URL : https://vk.com/doc89552318_498802628?hash=67d67b419d53b31611&dl=6994a3d94e6effe2d8 (дата обращения: 20.04.2020). - Загл. с экрана. - Яз. рус.

6 Gorin, D. A. Effect of Layer-by-Layer Electrostatic Assemblies on the Surface Potential and Current Voltage Characteristic of Metal-Insulator-Semiconductor Structures / D. A. Gorin, A. M. Yashchenok, A. O. Manturov, T. A. Kolesnikova, H. Möhwald // Langmuir. - 2009. - V. 25, № 21. - P. 12529-12534.