

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

Кафедра материаловедения, технологии  
и управления качеством

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗНАКА ЗАРЯДА МОЛЕКУЛ ФЕРМЕНТА В РАСТВОРЕ  
С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА ВОЛЬТ-АМПЕРНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК**

**АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

студента 4 курса 4091 группы  
направления 22.03.01 «Материаловедения и технологии материалов»,  
профиль «Нанотехнологии, диагностика и синтез современных материалов»  
института физики

Ткачева Дениса Владимировича

Научный руководитель,  
доцент, к.ф.-м.н., доцент  
\_\_\_\_\_

должность, уч. степень, уч. звание

\_\_\_\_\_

подпись, дата

С.В. Стецюра  
\_\_\_\_\_

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой,  
д.ф.-м.н., профессор  
\_\_\_\_\_

должность, уч. степень, уч. звание

\_\_\_\_\_

подпись, дата

С.Б. Вениг  
\_\_\_\_\_

инициалы, фамилия

Саратов 2022

**Введение.** Фермент пероксидаза хрена (horseradish peroxidase, сокращенно HRP) – это один из широкоиспользуемых ферментов. HRP используется в аналитической биохимии и биотехнологии для иммунохимического определения антител, ДНК, низкомолекулярных соединений, применяется в био- и иммуносенсорах, хемилюминесцентной, флуоресцентной и электрохимической системах детекции, является катализатором окисления фенольных соединений пероксидом водорода. Пероксидаза хрена также используется при изготовлении амперометрических сенсоров, основанных на прямом переносе электронов. Также фермент HRP широко применяется в природоохранных технологиях, поскольку эффективно окисляет множество ароматических соединений и некоторые важные промышленные красители. Помимо широкого использования можно отметить, что фермент пероксидазы хрена относительно дешевле и доступнее других пероксидаз [1-4].

Ввиду широкого использования тема изучения свойств пероксидазы хрена является безусловно актуальной. Также в пользу актуальности изучения этого фермента можно привести несколько статей за последние годы, авторы которых разрабатывают различные направления, связанные с технологией и свойствами этого фермента. Так, например, в своей статье [5] Florian W. изучает наиболее эффективные способы создания рекомбинантной пероксидазы хрена. Или, например, в статье [6] от Nikolaos G. рассказывается о влиянии магнитного поля на скорость реакции фермента пероксидазы хрена.

Целью выпускной квалификационной работы является исследование вольт-амперных характеристик структур Si/SiO<sub>2</sub>/HRP, помещенных в раствор электролита, при разных условиях адсорбции HRP для определения знака эффективного заряда молекул HRP в водном растворе.

На основе поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- поиск научной литературы по цели исследования, включая перевод статей из иностранных журналов;

- структурирование и анализ информации по цели исследования, выявление актуальных направлений по этой теме в науке;
- планирование эксперимента, изучение оборудования для исследования;
- подготовка кремниевых подложек 2-х типов проводимости и получение на их основе слоистых гибридных структур с чувствительным слоем на основе фермента пероксидазы хрена;
- проведение исследований ВАХ в 2-х режимах – статическом и кинетическом до, после и вовремя адсорбции молекул HRP на кремниевую подложку;
- анализ изменений ВАХ структур Si/SiO<sub>2</sub>/HRP, помещенных в раствор электролита, при разных условиях адсорбции HRP с учетом типа проводимости кремния и возможного заряда молекул HRP в растворе.

Дипломная работа занимает 32 страницы, имеет 16 рисунков и 2 таблиц.

Обзор составлен по 19 информационным источникам.

Во введение рассматривается актуальность работы, устанавливается цель и выдвигаются задачи для достижения поставленной цели.

Первый раздел представляет собой ознакомление с ферментом HRP (общие сведения о молекуле, её строение, электрофизические, электрохимические и каталитические свойства), гибридной структурой Si/SiO<sub>2</sub>/HRP, экспериментальной установкой для исследований (зондовая станция Cascade Microtech, прибор Agilent Technologies B1500A и программа EasyEXPERT), электрохимической ячейкой, электродом сравнения и буферным раствором.

Во втором разделе работы содержится экспериментальная часть, а именно данные о фоточувствительности подложек, о изменении ВАХ гибридных структур до, вовремя и после адсорбции фермента на них в статистическом и кинетическом режимах. А также анализ этих данных.

## Основное содержание работы

Основная часть работы представляет собой обзор литературы теме работы и практическую часть с результатами данной работы.

Первый раздел содержит обзор литературы о актуальности исследований фермента HRP. Пероксидаза хрена является наиболее широко используемым ферментом в иммуноферментных диагностических наборах со спектрофотометрической детекцией. В конце прошлого века был популярен в использовании хемолюминесцентный анализ с использованием пероксидазы хрена. В настоящее время на основе рекомбинантных пероксидаз разрабатываются высокочувствительные биосенсоры для определения различных соединений в сложных многокомпонентных смесях, в том числе и при анализе загрязнений в окружающей среде [7].

Одна из основных задач биосенсоров с использованием пероксидазы хрена заключается в определении субстрата пероксидазы – пероксида водорода. Задача является актуальной, так как пероксид водорода имеет значимую роль во множестве процессов как окружающей среды, так и живых организмов [8].

Основная проблема использования нативной пероксидазы хрена в роли биораспознающего элемента – это скорость регистрации прямого переноса электрона на сенсорный электрод, которая является очень низкой, меньше  $2 \text{ с}^{-1}$  (электронов в секунду). Данная проблема объясняется несколькими причинами. Активный центр пероксидазы хрена находится глубоко в гидрофобном кармане глобулы, из-за чего расстояние для переноса электрона велико. Также гликозилированные HRP к электроду.

Однако развитие генной инженерии позволяет создавать рекомбинантные формы пероксидазы хрена с изменённой структурой, что позволяет сократить расстояние между электроном и активным центром молекулы. В научной статье [9] изучалась электрохимическая активность нативной и рекомбинантной ПХ. Рекомбинантная пероксидаза хрена, полученная методом генной инженерии, в отличие от нативной пероксидазы, не имеет углеводных

остатков и поэтому имеет меньший размер по сравнению с нативным ферментом.

Во втором разделе показано изменение ВАХ гибридных структур до, во время и после адсорбции фермента на них в статистическом (рисунки 1-4) и кинетическом режимах (рисунки 5-8).

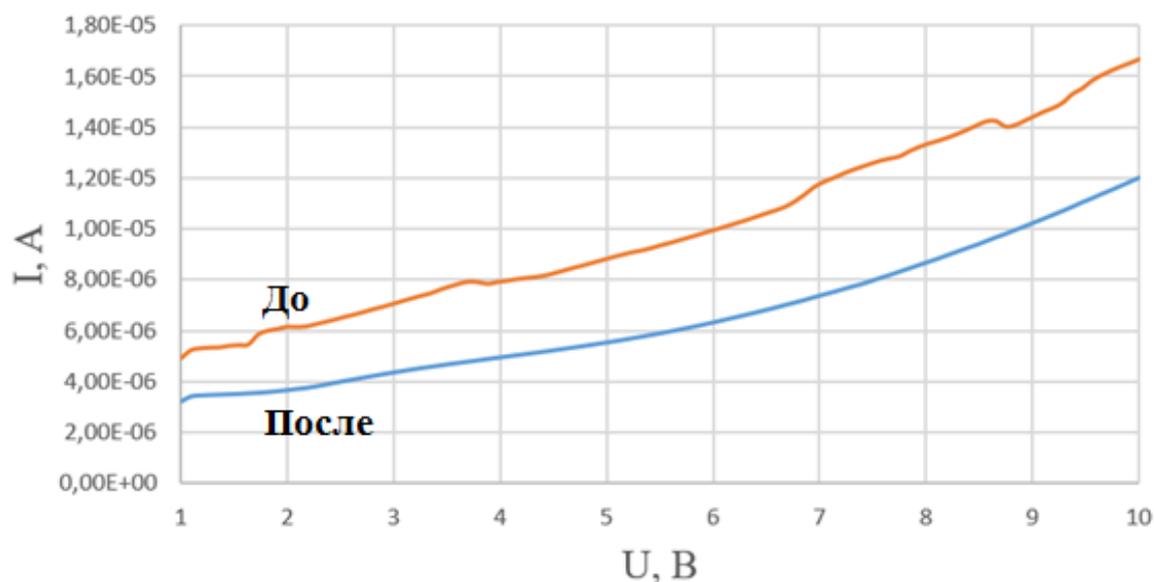


Рисунок 1 – ВАХ для гибридной структуры p-Si/SiO<sub>2</sub>/HRP, помещенной в буферный раствор, при напряжении от +1 до +10 В на подложке, где синим цветом – до нанесения фермента, оранжевым – после

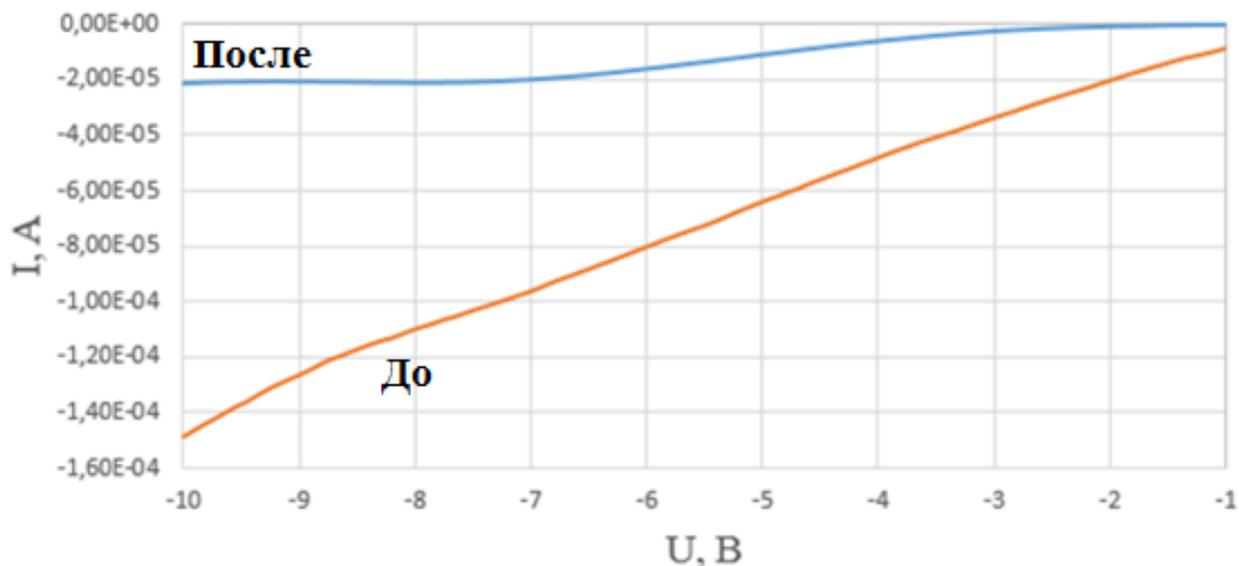


Рисунок 2 – ВАХ для гибридной структуры p-Si/SiO<sub>2</sub>/HRP, помещенной в буферный раствор, при напряжении от -10 до -1 В на подложке, где синим цветом – до нанесения фермента, оранжевым – после

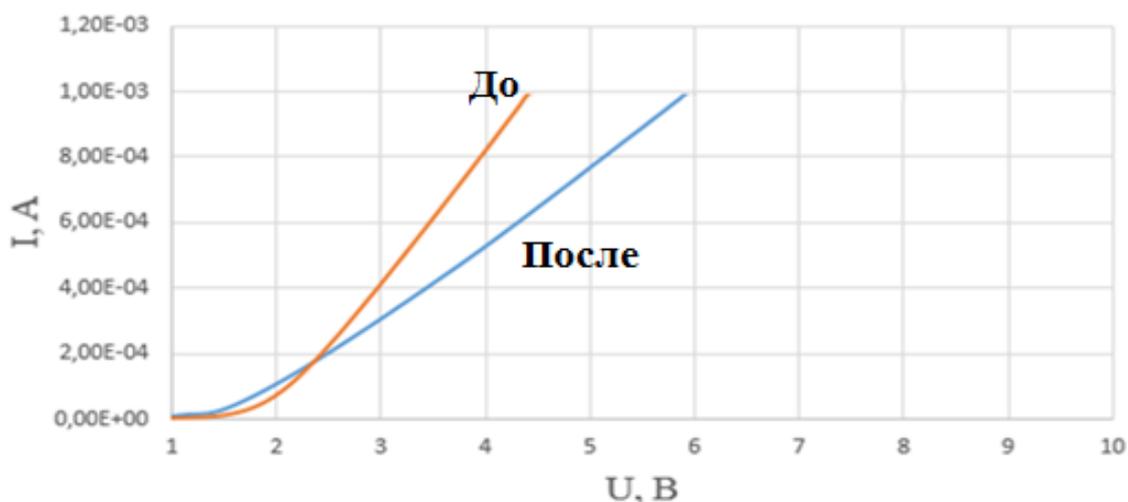


Рисунок 3 – ВАХ для гибридной структуры n-Si/SiO<sub>2</sub>/HRP, помещенной в буферный раствор, при напряжении от +1 до +10 В на подложке, где синим цветом – до нанесения фермента, оранжевым – после

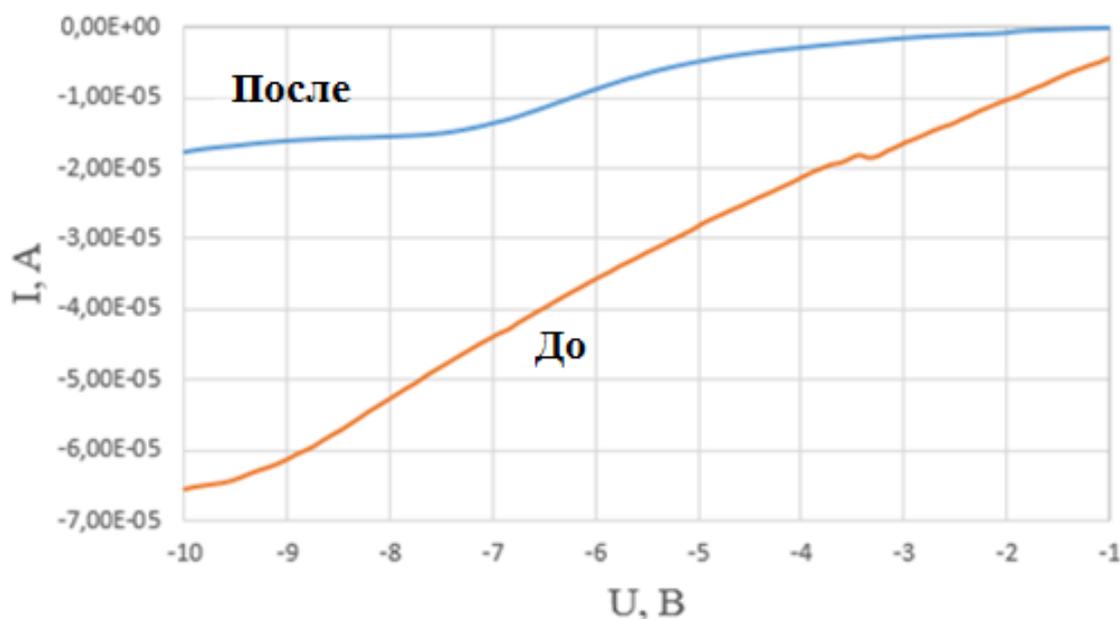


Рисунок 4 – ВАХ для гибридной структуры n-Si/SiO<sub>2</sub>/HRP, помещенной в буферный раствор, при напряжении от -10 до -1 В на подложке, где оранжевым цветом – до нанесения фермента, синим – после

Для анализа результатов, необходимо провести статистический анализ.

Поскольку при измерениях ВАХ на рисунке 3 возникло предельно допустимое значение тока, и диапазон напряжений был сужен, то сравнивать придётся при напряжении  $U_0 = \pm 4$  В.

Из статистического анализа следует, что более значительные изменения тока после нанесения слоя фермента происходят при отрицательном

потенциале на полупроводниковой подложке. Причем в случае p-Si эти изменения больше.

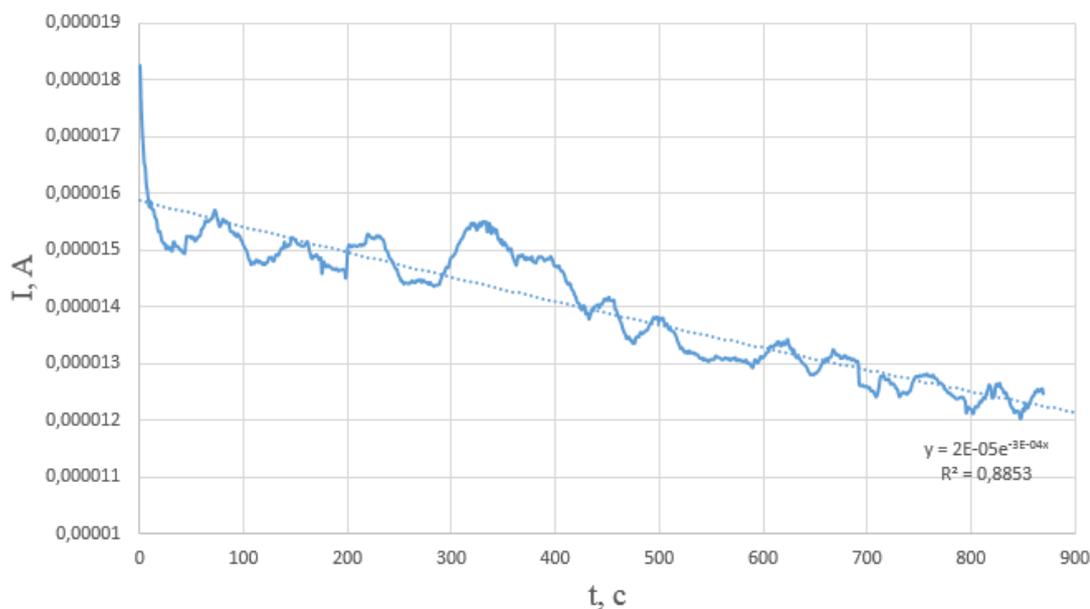


Рисунок 5 – График зависимости тока от времени, измеренный во время адсорбции пероксидазы хрена на гибридную структуру p-Si/SiO<sub>2</sub> при напряжении +10 В на подложке

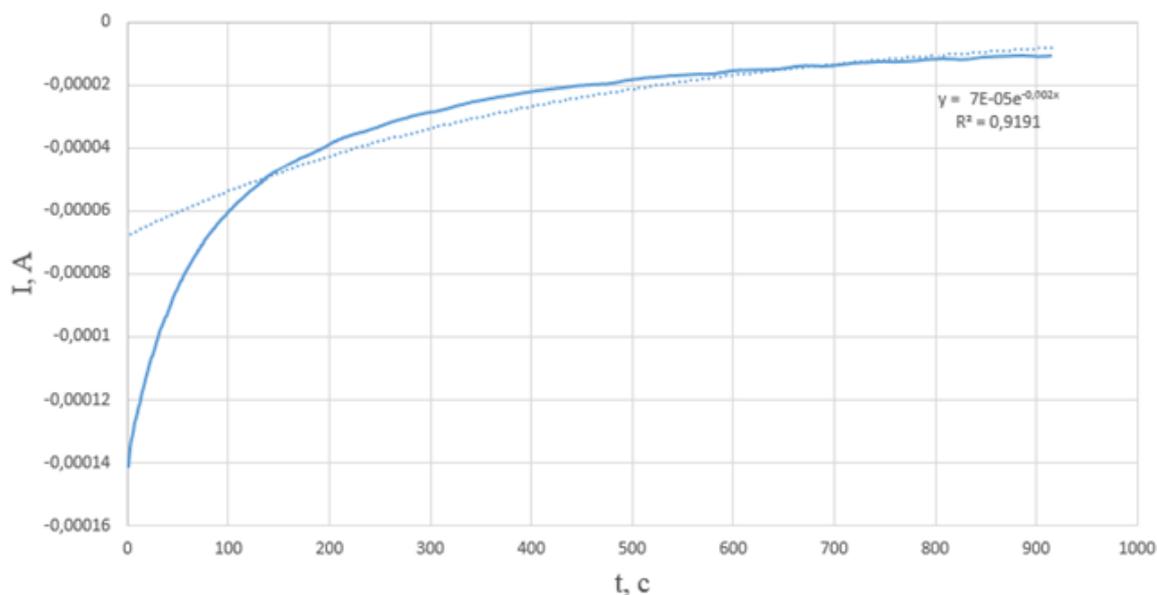


Рисунок 6 – График зависимости тока от времени, измеренный во время адсорбции пероксидазы хрена на гибридную структуру p-Si/SiO<sub>2</sub> при напряжении -10 В на подложке

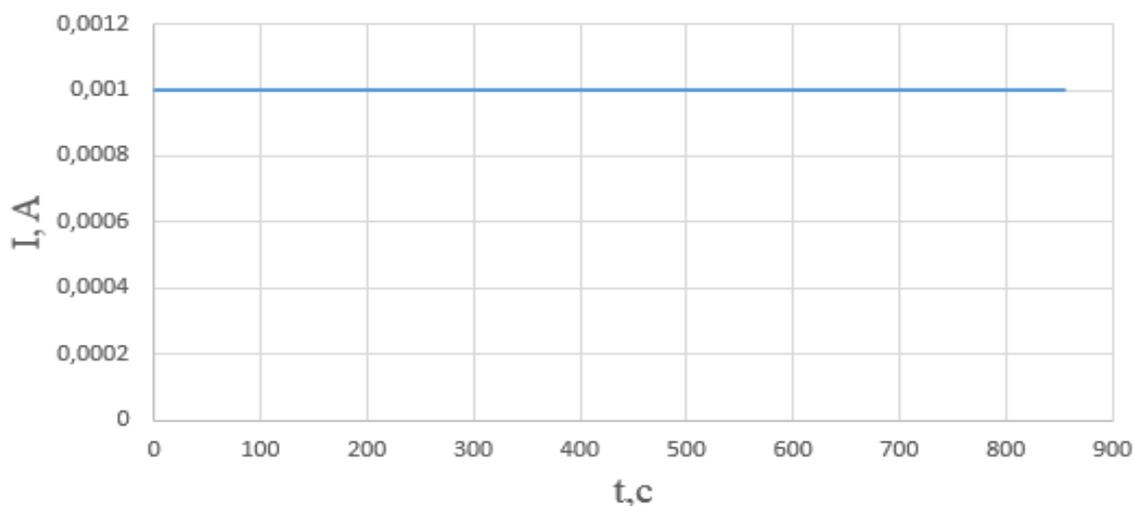


Рисунок 7 – График зависимости тока от времени, измеренный во время адсорбции пероксидазы хрена на гибридную структуру n-Si/SiO<sub>2</sub> при напряжении +10 В на подложке

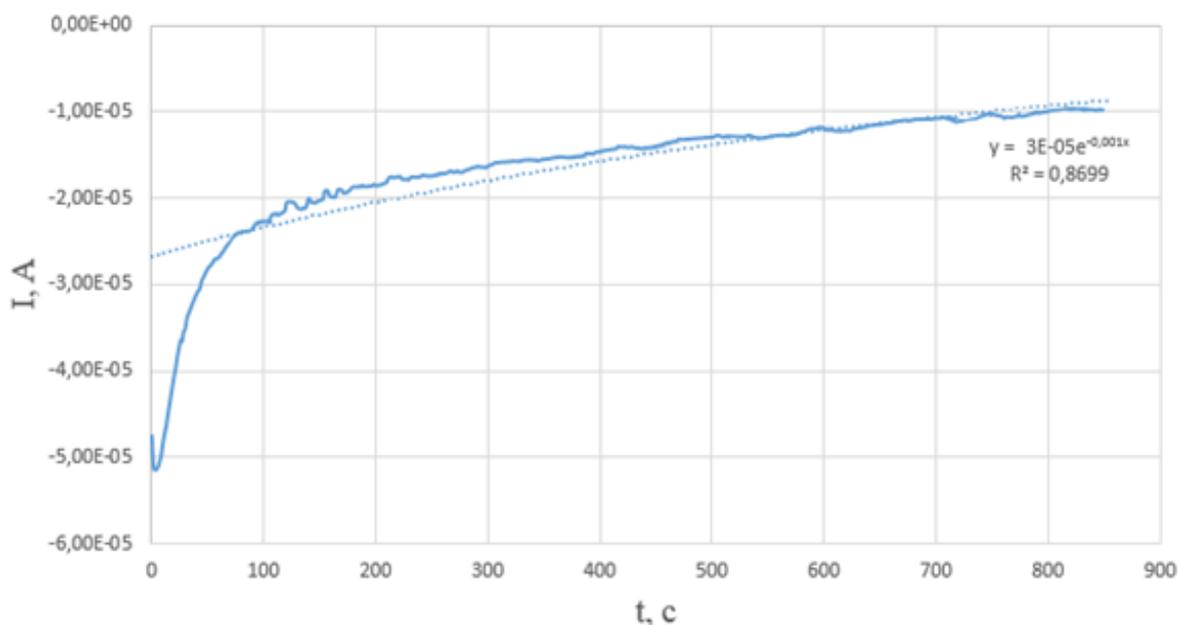


Рисунок 8 – График зависимости тока от времени, измеренный во время адсорбции пероксидазы хрена на гибридную структуру n-Si/SiO<sub>2</sub> при напряжении -10 В на подложке

Для анализа результатов, необходимо провести кинетический анализ.

В результате полученные данные подтвердили вывод из статистического анализа, что более значительные изменения тока после нанесения слоя фермента происходят при отрицательном потенциале на полупроводниковой подложке. Причем в случае p-Si эти изменения больше.

**Заключение.** Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что при положительном напряжении ВАХ изменилась слабо, что означает, что пероксидаза хрена отталкивалась от пластины кремния. А при отрицательном напряжении ВАХ изменились сильно. Это говорит о том, что фермент обладает положительным зарядом в водном растворе.

В ходе выполнения ВКР также были получены следующие результаты:

- была собрана информация о ферменте пероксидазы хрена и актуальности его исследования и проведено ознакомление с понятием изоэлектрической точки, зависимостью каталитических свойств от pH раствора;
- установлено, что фермент HRP проявляет амфотерные свойства. При использовании в технологии электростатического механизма адсорбции молекул HRP на подложку знание заряда молекулы в растворе становится очень важным, но различия сведений из научной литературы не позволяют точно определить изоэлектрическую точку, а, следовательно, и заряд молекулы;
- разработана методика проведения эксперимента, которая позволит установить знак эффективного заряда молекулы HRP при заданной pH;
- описаны лабораторные образцы для исследований, приведена методика их обработки;
- получены слоистые гибридные структуры с чувствительным слоем на основе фермента пероксидазы хрена, приведена методика их обработки;
- изучена измерительная установка для проведения эксперимента – зондовая станция «CascadeMicrotech» с анализатором полупроводниковых приборов Agilent B1500A, а также подробно изучен алгоритм измерения ВАХ, необходимых для реализации поставленных целей;
- после нанесения фермента пероксидазы хрена, адсорбированный слой образовал дополнительное, последовательное сопротивление на подложке. Поскольку в одном из замеров возникло предельно допустимое значение, то статистический анализ пришлось проводить при напряжении  $U_0 = \pm 4$  В. После адсорбции фермента HRP на гибридных структурах p- и n-типа при положительном напряжении +4 В значения сил тока изменились в 1,61 и 1,55

раз. На гибридных структурах р- и n-типа при отрицательном напряжении -4 В значения сил тока изменились в 8,11 и 7,55 раз. Таким образом, более значительные изменения тока после нанесения слоя фермента происходят при отрицательном потенциале на полупроводниковой подложке. Причем в случае р-Si эти изменения больше;

- при кинетическом анализе во время адсорбции фермента HRP на гибридной структуре р-типа при положительном напряжении +10 В значение силы тока через 200 секунд уменьшилось на 20,5%, а к концу адсорбции – на 31,6%. Для гибридной структуры n-типа при положительном напряжении +10 В анализ провести не удалось. Во время адсорбции фермента HRP на гибридных структурах р- и n-типа при отрицательном напряжении -10 В значения сил тока через 200 секунд уменьшились на 56,6% и 64,2%, а к концу адсорбции – на 92,3% и 79,6%. То есть наиболее сильные изменения тока наблюдались при отрицательном напряжении на гибридной структуре. Можно предположить, что изменение силы тока во времени пропорционально скорости образования покрытия и росту его толщины;

- После нанесения фермента HRP на подложку, ВАХ изменяется не только из-за появляющегося покрытия с определённой толщиной, плотностью и проводимостью. Заряд молекул самого покрытия влияет на толщину ОПЗ в подложке, что тоже изменяет суммарное сопротивление гибридной структуры и влияет на ВАХ.

Таким образом, сделан вывод, что фермент пероксидаза хрена в водном растворе при рН = 6,3-6,8 обладает выраженным положительным зарядом.

#### **Список использованных источников**

1 Григоренко, В. Г. Рекомбинантная пероксидаза хрена: получение и использование в аналитических целях / В. Г. Григоренко, И. П. Андреева, М. Ю. Рубцова, А. М. Егоров // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 4. – С. 480-488.

2 Кайгородов, К. Л. Синтез диванилина в присутствии водной вытяжки и сока корня хрена / К. Л. Кайгородов, М. А. Смирнова, В. Е. Тарабанько // Journal of Siberian Federal University. – 2020. – Т. 13, № 4. – С. 525-533.

3 Фам, Т. Ч. Деструкция некоторых экополлютантов с участием ферментов : бакалаврская работа. ...бакалавр : 04.03.01 / Фам Тхи Чинь ; науч. рук. О. Е. Лебедева ; НИУ «БелГУ». – Белгород, 2019. – 44 с.

4 Guido, R. Horseradish peroxidase (HRP) as a tool in green chemistry / R. L. Guido, C. G. Diana, M.S. Artur // RSC Advances. – 2014. – V. 4. – P. 37244-37265.

5 Florian, W. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications / W. Florian, G. Anton // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2015. – V. 99. – P. 1611-1625.

6 Nikolaos, G. Activity Increase of Horseradish Peroxidase in the Presence of Magnetic Particles / G.C. Nikolaos, K. Patarawan, P.G. Emmanuel // JACS. – 2008. V. 130, № 10. – P. 2910-2911.

7 Газарян, И. Г. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений / И. Г. Газарян, Д. М. Хушпульян, В. И. Тишков // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303-322.

8 Преснова, Г. В. Электрохимические биосенсоры на основе пероксидазы хрена / Г. В. Преснова, М. Ю. Рубцова, А. М. Егоров // Российский химический журнал. – 2008. – Т. 52, № 2. – С. 60-65.

9 Presnova, G. Direct heterogeneous electron transfer of recombinant horseradish peroxidases on gold / G. Presnova, V. Grigorenko, A. Egorov, T. Ruzgas, A. Lindgren, L. Gorton, T. Borchers // Faraday Discussions. – 2000. – V. 116. – P. 281-289.