

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 ОСВЕЩЕНИЯ И ЗАРЯДА МОЛЕКУЛ ФЕРМЕНТА НА
ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИХ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА
ПОЛУПРОВОДНИКОВЫЙ ТРАНСДЬЮСЕР**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки магистратуры 2 курса 2295 группы
направления 22.04.01 «Материаловедение и технологии материалов»,
профиль «Материаловедение фармацевтического и медицинского назначения»
института физики

Масленниковой Арины Алексеевны

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. 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. Адсорбцией можно управлять, изменяя механизм электростатического взаимодействия компонентов биосенсорной гибридной структуры [1-2].

Увеличение концентрации фермента на поверхности при прочих равных условиях возможно благодаря использованию освещения из области поглощения S_i во время иммобилизации фермента [3-4]. Повлиять на зарядовое состояние поверхности подложки можно не только освещением с длинами волн из спектра поглощения S_i , но и за счет использования катионного буферного слоя (например, полиэтиленимина – ПЭИ). На эффективный заряд фермента в водном растворе можно влиять, изменяя ионную силу этого раствора путем добавления неорганической хорошо растворимой соли.

Кроме электростатического взаимодействия коррективы в результаты эксперимента вносят строение, конформация и распределение зарядов в сложных молекулах фермента. Поэтому для выявления общих закономерностей и возможности прогнозирования результатов фотостимуляции при создании ферментных биосенсоров были проведены исследования с ферментами глюкозооксидазой (GOx) и пероксидазой хрена (HRP).

Целью выпускной квалификационной работы является определение влияния освещения и заряда молекул фермента на эффективность иммобилизации GOx и HRP на полупроводниковый трансдьюсер.

На основе поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- 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 при варьировании условий освещения и ионной силы раствора, из которого будет осуществляться адсорбция органических молекул;

- определить электрический потенциал и размер органических молекул при помощи анализатора Malvern Zetasizer Nano Series;

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

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

- исследовать топографию поверхности полученных образцов и контактной разности потенциалов между зондом и поверхностью гибридных структур при помощи инструментов анализа модульной программы для визуализации и анализа данных сканирующей зондовой микроскопии Gwyddion;

- провести анализ результатов, разработать рекомендации по совершенствованию метода фотостимулированной адсорбции ферментов на полупроводниковую подложку;

- сформулировать общие выводы и перспективы исследования.

Дипломная работа занимает 83 страницы, имеет 47 рисунков и 1 таблицу. Обзор составлен по 61 информационному источнику. Во введении рассматривается актуальность работы, устанавливается цель и выдвигаются задачи для достижения поставленной цели.

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. Существует ряд факторов, влияющих на чувствительность биосенсорных систем. Поэтому для улучшения характеристик биосенсорных структур, работающих на полевом эффекте и использующих в качестве иммобилизованного биоузнающего элемента фермент, был выбран путь разработки (модификации) условий адсорбции молекул фермента, 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 фермента 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 фермента, можно сделать предположения и разработать рекомендации по изменению условий адсорбции (рисунок 1) молекул для получения высокочувствительной биосенсорной структуры.

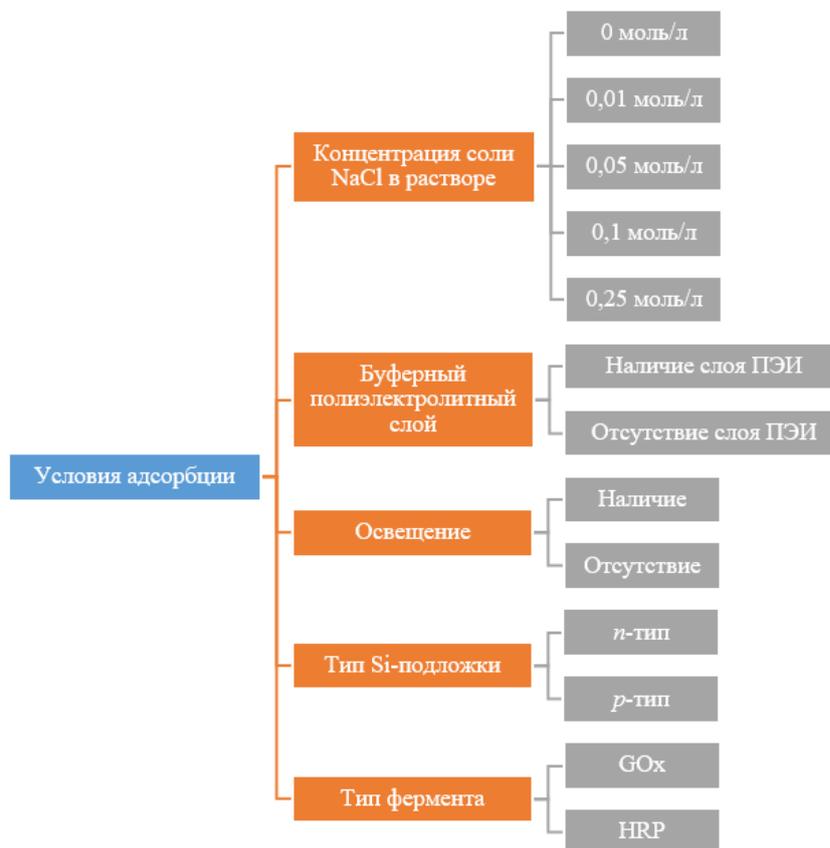


Рисунок 1 – Варьируемые условия адсорбции фермента в ходе эксперимента

В качестве ферментов были использованы глюкозооксидаза и пероксидаза хрена. Выбор ферментов был обусловлен их активным использованием в биосенсорах и различиями в строении, принципиальным условием являлось наличие электрического заряда у фермента в растворе.

В результате проведения измерений было исследовано 40 образцов с различными в зависимости от условий получения органическими слоями, к 18 из которых дополнительно применялась фотостимуляция полупроводниковой подложки во время адсорбции фермента.

Технология создания органических слоев биосенсорных структур и характеристики используемых компонентов. В качестве полупроводникового преобразователя сигнала использовались пластины монокристаллического кремния *n*- и *p*-типа, на которые методом послойной адсорбции наносились непосредственно или с буферным слоем полиэтиленimina молекулы фермента 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 2). Время освещения составляло 10 минут. Освещённость в центре светового пятна была примерно 20000 лк.

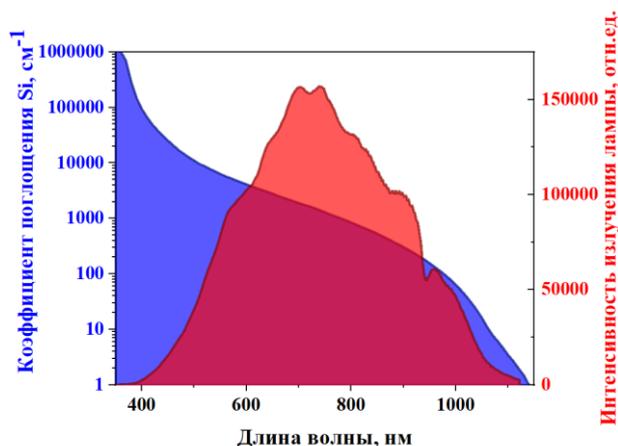


Рисунок 2 – Спектр поглощения кремния (синий) и спектр интенсивности излучения галогенной лампы (красный)

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 $75\text{ }^\circ\text{C}$. Такая обработка приводит к удалению органических загрязнений и активизации отрицательно заряженных ОН-групп на поверхности Si [5]. Затем образцы промывались в деионизированной воде в течение 10 минут и сушились в потоке сухого азота.

В качестве полиэлектролита для буферного слоя был выбран полиэтиленимин ($-\text{C}_2\text{H}_5\text{N}-$)_x, молекулярная масса которого составила 25 а. е. м.. Это катионный полиэлектролит, растворимый в воде и обладающий высокими адсорбционными свойствами, часто используемый в качестве интерфейсного слоя при создании датчиков [6]. Для адсорбции молекул полиэлектролита использовались водные растворы с концентрацией полиэтиленимина 1 мг/мл. Время адсорбции органических молекул было постоянным и составляло 10 минут.

Глюкозооксидаза – фермент, используемый в ходе эксперимента. Молекулярная масса GOx составляет 160 а. е. м.. В воде она является анионом. Молекулы GOx осаждались из водных растворов с концентрацией белка 0,5 мг/мл. Время адсорбции GOx осталось таким же, как и для осаждения ПЭИ.

Пероксидаза хрена – фермент, используемый в ходе эксперимента. Молекулярная масса HRP составляет около $44 \cdot 10^3$ а. е. м., 18-22% приходится на углеводную часть. Молекулы HRP осаждались из водных растворов с концентрацией белка 0,5 мг/мл. Интерес к этому ферменту обусловлен его широким применением, отличием от фермента глюкозооксидазы повышенной амфотерностью свойств и относительно малыми размерами. Время адсорбции HRP осталось таким же, как и для осаждения ПЭИ.

Времена и концентрации выбирались в соответствии со значениями, часто используемыми на практике и признанными оптимальными для создания однородного слоя [5,7].

После всех выше перечисленных действий следовала промывка полученных образцов в деионизированной воде в течение 10 минут и сушка в потоке сухого азота.

Следуя технологическому алгоритму, были получены покрытия с воспроизводимыми параметрами, что подтвердилось измерениями полученных образцов с помощью установки ИНТЕГРА Спектра.

Методы и режимы исследования органических компонентов в растворе и после иммобилизации на подложку. В работе изучался электрический потенциал компонентов биосенсорной структуры. 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 (АСМ), а также контактная разность потенциалов между зондом и поверхностью – методом сканирующего зонда Кельвина.

Сканирование осуществлялось построчно АСМ зондами, предназначенными для работы в прерывисто-контактном режиме, серии НА_NC/W2C (High Accuracy NonContact) ETALON. Каждый чип имеет 2 балки. Средние значения резонансных частот 235 кГц и 140 кГц, средние значения силовых констант 12 Н/м и 3,5 Н/м. Зонды покрыты прочным проводящим слоем W_2C , который увеличивает их срок службы, и позволяет проводить измерения при приложенных высоких напряжениях и протекающих токах в точке контакта «игла-образец», а также в условиях повышенной влажности. Кантилеверы имеют Au отражающее покрытие для увеличения сигнала лазера. Радиус кривизны зондов серии ETALON менее 35 нм, поэтому можно говорить о высокой точности измерений [8].

Для получения АСМ-сканов высокого разрешения сканирование дополнительно осуществлялось зондами серии NSG01_DLC. Это супер острые зонды с радиусом кривизны 1 нм, предназначенные для работы в бесконтактном или полуконтактном режимах. Средние значения резонансных частот 190 кГц и 115 кГц, средние значения силовых констант 10 Н/м и 2,5 Н/м. За счёт износостойкого материала DLC-зонды имеют долгий срок службы [9].

Заключение. В настоящее время ферментные биосенсоры охватывают различные сферы деятельности человека, среди которых охрана окружающей среды, пищевая промышленность, здравоохранение и биотехнологии. Медицинский анализ биологических жидкостей и продуктов обмена веществ, образующихся в процессе метаболизма, заслуживает особого внимания, поскольку обеспечивает надлежащий контроль за изменением состояния здоровья пациентов.

В ходе выполнения практической части работы были получены партии образцов, представляющих собой слоистые гибридные структуры *n*-

Si/SiO₂/GOx, *n*-Si/SiO₂/ПЭИ/GOx, *n*-Si/SiO₂/HRP, *p*-Si/SiO₂/HRP, *n*-Si/SiO₂/ПЭИ/HRP и *p*-Si/SiO₂/ПЭИ/HRP для использования в биосенсорике. Органические слои на кремниевую подложку наносились методом послойной адсорбции из раствора. Ряд экспериментов проводился при дополнительной фотостимуляции полупроводниковой подложки во время адсорбции органических слоев.

Общими для всех результатов являются следующие выводы:

- нанесение органических молекул приводит к увеличению средней высоты неровностей, при этом изменение $N_{ср}$ коррелирует с размерами наносимых молекул;

- когда наносится предварительно слой ПЭИ, то получаем при тех же условиях адсорбции гораздо большую плотность иммобилизованных молекул фермента по сравнению с образцами без буферного слоя;

- использование освещения во время иммобилизации органических слоев способствует увеличению количества осаждаемых молекул фермента, но эффективность от фотостимуляции кремниевой подложки существенно падает при нанесении буферного слоя ПЭИ.

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

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 Маляр, И. В. Влияние освещения на параметры полимерного покрытия, осаждаемого из раствора на полупроводниковую подложку / И. В. Маляр, S. Santer, С. В. Стецюра // Письма в ЖТФ. – 2013. – Т. 39, вып. 14. – С. 69-76.

4 Malyar, I. V. Photocontrolled Adsorption of Polyelectrolyte Molecules on a Silicon Substrate / I. V. Malyar, D. A. Gorin, S. Santer, S. V. Stetsyura // *Langmuir*. – 2013. – V. 29, № 52. – P. 16058-16065.

5 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.

6 Chang, C. Y. CO₂ detection using polyethylenimine/starch functionalized AlGa_N/Ga_N high electron mobility transistors / C. Y. Chang, B. S. Kang, H. T. Wang, F. Ren, Y. L. Wang, S. J. Pearton, D. M. Dennis, J. W. Johnson, P. Rajagopal, J. C. Roberts, E. L. Piner, and K. J. Linthicum // *Applied Physics Letters*. – 2008. – V. 92, № 23. – P. 232102 (3 p.).

7 Yashchenok, A. M. Impact of magnetite nanoparticle incorporation on optical and electrical properties of nanocomposite LbL assemblies / A. M. Yashchenok, D. A. Gorin, M. Badylevich, A. A. Serdobintsev, M. Bedard, Y. G. Fedorenko, G. B. Khomutov, D. O. Grigoriev, H. Möhwald // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2010. – V. 12. – P. 10469-10475.

8 Кантилеверы серии HA_NC/W2C ETALON [Электронный ресурс] // Проводящие АСМ кантилеверы серии ETALON – NT-MDT Tips [Электронный ресурс] : [сайт]. – URL : <https://www.ntmdt-tips.com/products/group/ha-cond> (дата обращения: 01.06.2022). – Загл. с экрана. – Яз. рус.

9 Кантилеверы серии NSG01_DLC [Электронный ресурс] // Проводящие Супер острые АСМ зонды [Электронный ресурс] : [сайт]. – URL : <https://tipsnano.ru/catalog/afm-special/super-sharp/> (дата обращения: 01.06.2022). – Загл. с экрана. – Яз. рус.