

УДК 577.112.4

## ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ ОКСИДА КРЕМНИЯ ПРИ СОЗДАНИИ РЕЦЕПТОРНОГО СЛОЯ БИОСЕНСОРА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВЗРЫВЧАТЫХ ВЕЩЕСТВ

Н.В. Комарова, М.С. Андрианова, М.И. Савельев, А.Е. Кузнецов

(НПК «Технологический центр»; e-mail: nat.v.kom@gmail.com)

Описан процесс разработки рецепторного слоя ферментативного биосенсора для детекции взрывчатых веществ. Обоснован выбор ковалентной модификации для иммобилизации нитроредуктазы из *Escherichia coli* на подзатворном диэлектрике ион-чувствительного полевого транзистора (ISFET), представляющем собой оксид кремния. Для проведения иммобилизации выбран подход самособирающихся монослоев, предполагающий использование различных силанов и молекул-линкеров для активации поверхности  $\text{SiO}_2$ . Проведено сравнение двух разных методик иммобилизации на поверхности  $\text{SiO}_2$  с применением двух асимметричных линкеров (N-гидроксисукцинимидный эфир 3-малеимидобензойной кислоты и N-гидроксисукцинимидный эфир 4-(4-малеимидофенил)масляной кислоты) и одного симметричного (глутаровый альдегид) в сочетании с соответствующими силанами. Изучена зависимость эффективности функционализации от концентрации силанов для подхода с использованием асимметричного линкера. Достаточная плотность посадки фермента на поверхности оксида кремния достигалась при концентрации силана 0,0015%. Тип асимметричного линкера не оказал влияния на эффективность иммобилизации. Показано, что методика иммобилизации через глутаровый альдегид позволяет добиться более высокой активности иммобилизованного фермента. Для данной методики оптимизированы условия проведения иммобилизации фермента на поверхности оксида кремния. Методика адаптирована для проведения иммобилизации нитроредуктазы из *E. coli* в канале микрофлюидной системы на поверхности ISFET, для чего аминопропилтриэтоксисилан заменен на соответствующий силатран, а концентрация фермента увеличена до 30 мкг/мл. Разработанная методика успешно использована для создания биосенсора для детекции взрывчатых веществ.

**Ключевые слова:** фермент, иммобилизация, самособирающиеся монослои, биосенсор.

Иммобилизация ферментов и различных биологических рецепторов на поверхности является важнейшим шагом в процессе разработки биосенсоров. Во всех случаях ставится задача покрыть поверхность целевыми молекулами с максимальной плотностью при сохранении их активности. К сожалению, при иммобилизации белков на твердом носителе возможны изменения структуры, приводящие к потере функциональности и стабильности белка. Для создания белковых пленок на поверхности разработано большое число подходов, как физических, так и химических. Подходы, используемые для иммобилизации ферментов, можно условно разделить на четыре группы: физическая сорбция, ковалентное связывание, биоафинное связывание и включение в полимерную сетку [1, 2]. Методы ковалентной модификации наиболее популярны благодаря их высокой специфичности, стабильности и скорости [3]. Кроме того, ковалентная иммобилизация фер-

ментов позволяет получить более высокий выход по активности иммобилизованного фермента [4].

Успех разработки методики иммобилизации зависит от типа носителя и свойств фермента. Мы разработали биосенсор для детекции взрывчатых веществ, использующий ион-чувствительный полевой транзистор (ion-sensitive field effect transistor, ISFET [5]) в качестве преобразователя сигнала и фермент нитроредуктазу из *E. coli* в качестве рецепторного слоя. ISFET представляет собой полевой транзистор, в котором в качестве затвора выступает раствор электролита. Транзистор детектирует любые изменения, связанные с изменением потенциала на границе раздела фаз подзатворный диэлектрик – электролит. При создании на поверхности подзатворного диэлектрика ISFET рецепторного слоя нитроредуктазы отклик транзистора становится избирательным к реакциям, катализируемым этим ферментом. Нитроредуктаза из *E. coli* катализирует восстановление

нитроароматических взрывчатых соединений при сопряженном окислении NADPH до NADP<sup>+</sup>. Таким образом, полученный биосенсор становится селективен и высокочувствителен к взрывчатым соединениям. В данной статье описан один из важнейших этапов создания биосенсора – разработка и оптимизация процесса иммобилизации фермента.

Чувствительная поверхность ISFET представляет собой тонкий слой оксида кремния. В нашем случае ковалентная иммобилизация на поверхности является наилучшим выбором в первую очередь исходя из соображений простоты процесса. Кроме того, в результате ковалентной иммобилизации молекулы фермента находятся максимально близко к поверхности сенсора, что обеспечивает его максимальную чувствительность [5]. Для поверхности оксида кремния самым популярным методом ковалентной модификации является подход с использованием самособирающихся монослоев силанов [6]. Характерной особенностью поверхности SiO<sub>2</sub> является наличие свободных гидроксильных групп. Молекулы силанов взаимодействуют с этими реакционно-способными ОН-группами. Самособирающиеся молекулы силанов обычно содержат три основные части: головную группу, алкильную цепь и хвостовую группу. Головная группа (например, триэтокси-, триметокси- или трихлорсилан) реагирует с гидроксогруппами поверхности оксида кремния, образуя устойчивую пленку на поверхности. Длина алкильной цепи влияет на устойчивость пленки в целом. Функциональная хвостовая группа придает полученной пленке требуемые химические или физические свойства. Получающиеся в результате самосборки пленки силанов отличаются высокой химической и физической стабильностью [7]. Преимущества такого подхода заключаются в однородности получаемого слоя фермента, сниженного риска денатурации белковых молекул и возможности встраивания в пленку агентов, предотвращающих обрастание микроорганизмами, в частности полиэтиленгликоля [2].

Полученный слой функциональных групп можно использовать для последующей ковалентной иммобилизации ферментов. Обычно для этого используют сшивающие агенты – линкеры, которые одним своим концом взаимодействуют с функциональными группами на поверхности пленки силана, а другим – с молекулами белка, пришивая их к поверхности. Выбор функциональной группы силана и линкера диктуется выбором групп на поверхности белка, через которые обеспечивают оптимальное проведение иммобилизации. Для ковалентной иммобилизации ферментов в качестве связующих используют ε-аминогруппу лизина или тиольную

группу остатка цистеина. Анализ первичной последовательности и трехмерной структуры нитроредуктазы из *E. coli*, доступной в базе данных PDB (PDB accession number 1YLR [8]), показал, что в ее аминокислотной последовательности встречаются 19 остатков лизина и только 1 – цистеина. Соответственно выбор был сделан в пользу методик модификации остатков лизина. Остатки лизина распределены по поверхности молекулы фермента неравномерно, и большая их часть расположена ближе к активному центру. В ходе разработки методики функционализации поверхности оксида кремния нитроредуктазой из *E. coli* проведено сравнение двух типов линкеров – асимметричных линкеров с разными функциональными группами на концах и популярного симметричного линкера глутарового альдегида.

### Экспериментальная часть

**Материалы.** Для проведения эксперимента мы использовали реактивы фирмы «Sigma Aldrich» (США):

рекомбинантная нитроредуктаза из *E. coli* K12 (90% чистоты);

гидрат тетра-натриевой соли восстановленной формы β-никотинамидадениндинуклеотид 2'-фосфата (NADPH, molecular biology grade);

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O («ч.д.а.»);

раствор фосфорной кислоты («ч.д.а.»), (3-аминопропил)триэтоксисилан (APTES, «х.ч.»);

(3-меркаптопропил)триметоксисилан (MPTES, «х.ч.») и триметоксипропилсилан (TMPS, «х.ч.»);

N-гидроксисукцинимидный эфир 3-малеимидобензойной кислоты (MBS, «ч.д.а.»);

N-гидроксисукцинимидил-4-(4-малеимидофенил)-бутират (SMBP, «ч.д.а.»), 1,3-динитробензол («ч.д.а.»).

Кроме того, использовали глутаровый альдегид («ч.д.а.»), «Mergsk», США), метанол и этанол («х.ч.»), «Химмед», Россия); ВЭЖХ-стандарт 2,4,6-тринитротолуола (TNT, «AccuStandard», США).

3-аминопропилсилатран (APS) был синтезирован согласно описанной ранее методике [9].

**Спектрофотометрия.** Измерение активности свободной нитроредуктазы проводили на микропланшетном спектрофлуориметре «Tecan Infinite M200», используя микропланшеты «Greiner Bio One 655001». Реакцию проводили в 50 мМ натрий-фосфатном буфере с pH 7,1. Реакционная смесь содержала 0,5 мМ NADPH, 0,15 мМ 1,3-динитробензола, нитроредуктазу из *E. coli* в концентрации от 1 до 4 мкг/мл. Общий объем смеси в ячейке составлял 280 мкл, что соответствует длине оптиче-

ского пути 0,8 см. Кинетические измерения проводили при 30°C в течение 30–45 мин, измеряя поглощение реакционной смеси в ходе реакции (длина волны 340 нм). При расчетах значений скорости реакции использовали коэффициент молярного поглощения NADPH, равный  $6220 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [10].

При измерении активности нитроредуктазы из *E. coli*, иммобилизованной на тестовых слайдах оксида кремния, измеряли падение поглощения реакционной смеси при длине волны 340 нм за 2–3 ч инкубирования слайдов в реакционной смеси в термощейкере «Eppendorf Thermomixer Comfort» (30°C, 300 об/мин). За единицу активности фермента принимали количество фермента, которое катализирует превращение 1 мкМ NADPH за 1 мин при 30°C.

**Определение концентрации белка.** Концентрацию нитроредуктазы из *E. coli* определяли по методу Лоури с использованием коммерческого набора Modified Lowry Protein Assay Kit (Fermentas, Литва) по инструкции производителя.

**Подготовка тестовых слайдов SiO<sub>2</sub>.** Для оптимизации условий проведения процесса иммобилизации были предварительно изготовлены кремниевые слайды с поверхностью, идентичной поверхности чувствительного элемента ISFET.

Для их получения КДБ-пластины (кремний с дырочной проводимостью, легированный бором, АОЗТ «Амекс», Россия) подвергали следующим стадиям обработки:

1) химическое окисление KAPO ( $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2 = 7:3$ ) + пар (1:1:5 =  $\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$ );

2) жидкостное химическое травление ( $\text{HF}:\text{HCl}:\text{H}_2\text{O} = 1:3:100$ );

3) плазменное окисление Oxford ( $T = 45 \pm 5^\circ\text{C}$ ,  $W = 1 \text{ кВт}$ ,  $P = 10 \text{ мТор}$ , расход  $20 \text{ см}^3/\text{мин}$ ,  $t = 20 \text{ мин}$ );

4) отжиг Oxford ( $T = 300^\circ\text{C}$ ,  $t = 30 \text{ мин}$ ).

После получения слоя SiO<sub>2</sub> проводили резку пластин алмазным диском на фрагменты размером 4×4 мм. Для удаления органических загрязнений поверхности перед последующими процедурами химической модификации все слайды обрабатывали в озонаторе «UV/Ozone ProCleaner™» («BioForce Nanosciences», США) в течение 10 мин.

#### **Иммобилизация нитроредуктазы из *E. coli***

**Иммобилизация нитроредуктазы из *E. coli* с использованием асимметричного линкера.** Тестовые слайды SiO<sub>2</sub> размером 4×4 мм инкубировали в 250 мкл 3%-го раствора MP TES (или сме-

си MP TES и TMPS) в метаноле в течение 1 ч при перемешивании (300 об/мин), последовательно промывали метанолом и этанолом (стадия 1). Затем слайды помещали в 250 мкл 4 мМ раствора MBS (или SMPB) в этаноле и инкубировали 1 ч при комнатной температуре и перемешивании при 300 об/мин, снова промывали этанолом и водой (стадия 2). Затем слайды помещали в 250 мкл раствора нитроредуктазы в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (pH 7,1) и инкубировали в течение 16–20 ч при +4°C (стадия 3). Слайды с иммобилизованным ферментом 3 раза промывали буферным раствором и измеряли активность связанного с поверхностью SiO<sub>2</sub> фермента.

**Иммобилизация нитроредуктазы из *E. coli* с использованием симметричного линкера.** Процедура иммобилизации нитроредуктазы на поверхности SiO<sub>2</sub> с использованием симметричного линкера аналогична описанной выше со следующими изменениями: стадия 1 – вместо MP TES использовали AP TES, а отмывку слайдов проводили метанолом и водой; стадия 2 – вместо раствора MBS/SMPB использовали 5%-й раствор глутарового альдегида в 50 мМ натрий-фосфатном буферном растворе (pH 7,1), инкубировали в течение 6 ч при комнатной температуре и 300 об/мин.

**Иммобилизация нитроредуктазы из *E. coli* с использованием аминопрописилатрана и глутарового альдегида.** В канал микрофлюидной системы на поверхности кристалла с ISFET с помощью пластикового шприца и полипропиленовых шлангов вводили 1 мМ раствор APS в воде, инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, затем проводили гидролиз при 60°C. Канал промывали водой и вводили в него 5%-й раствор глутарового альдегида в 50 мМ фосфатном буфере (pH 7,1); инкубировали в течение 6 ч. Затем снова промывали буферным раствором и вводили раствор фермента в концентрации не менее 30 мкг/мл. Инкубировали в течение 16–20 ч при температуре +4°C, несвязавшийся фермент смывали буферным раствором.

#### **Атомно-силовая микроскопия**

Поверхность оксида кремния после функционализации изучали с помощью атомно-силовой микроскопии на зондовом сканирующем микроскопе «Dimension ICON» («Bruker», США). Для получения изображений использовали зонды серии «RTESPA» («Bruker», США). Сканирование поверхности проводили в режиме Tapping Mode, размер изображения 1×1 мкм (256 точек на ли-

нию). Для обработки изображений использовали встроенные функции ПО Nanoscope Alalysis.

### Результаты и их обсуждение

**Иммобилизация фермента с использованием асимметричного линкера.** В качестве асимметричных линкеров использовали два различных реагента – N-гидроксисукцинимидил-4-(*n*-малеимидофенил)-бутират (SMPB) и N-гидроксисукцинимидил-3-малеимидобензоат (MBS). Это схожие гетеробифункциональные линкеры, содержащие N-гидроксисукцинимид-эфирную и малеимидную группы [11, 12] и отличающиеся друг от друга только длиной (11,6 Å для SMPB и 9,9 Å для MBS). Следовательно, пленки, полученные с их использованием, отличаются только толщиной. Гидроксисукцинимидная группа является активатором карбоксильной группы, повышающим ее нуклеофильность, что позволяет ей взаимодействовать с первичными аминами при pH 7–9 с образованием амидной связи. В свою очередь, малеимидные группы способны по активированной двойной связи присоединять тиольные группы по реакции Михаэля с образованием стабильной сульфидной связи при pH 6,5–7,5 [13]. Таким образом, исполь-

зование этих соединений делает возможной иммобилизацию белка либо через NH<sub>2</sub>-группы остатков боковой цепи, либо через SH-группы. Поскольку нитроредуктаза из *E. coli* содержит только один остаток цистеина, проводить ее иммобилизацию целесообразно через аминокетильные группы. Возникла задача создания на поверхности оксида кремния функционального слоя SH-групп для присоединения линкера, для чего был использован меркаптопропилтриэтоксисилан (MPTES). Схема реакции приведена на рис. 1. Стоит отметить, что не всегда при максимально высокой плотности посадки функционального сшивающего агента наблюдается самый высокий выход по активности ковалентно иммобилизованного фермента [14, 15]. Поэтому при проведении иммобилизации через бифункциональные линкеры мы одновременно изучали зависимость активности иммобилизованного фермента от концентрации MPTES. Для этого на первом этапе слайды кремния с оксидом инкубировали в смеси MPTES с триметоксипропилсиланом для формирования смешанных пленок. Общая концентрация силанов в реакционной смеси составляла 3%, при этом концентрацию MPTES варьировали от 1 до 100% от общего содержания силанов.

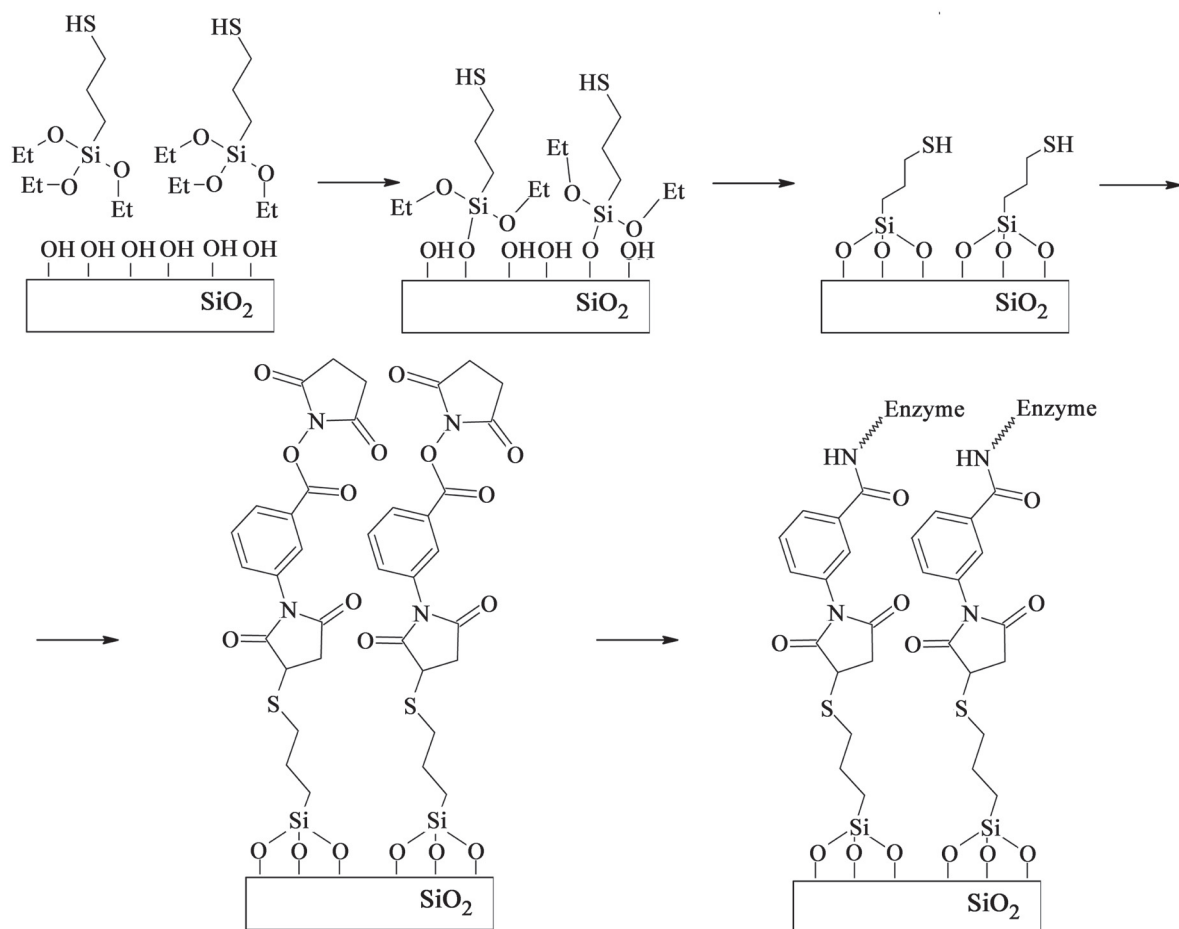


Рис. 1. Схема иммобилизации фермента через меркаптопропилтриэтоксисилан и N-гидроксисукцинимидный эфир 3-малеимидобензойной кислоты

Активность иммобилизованного фермента не зависела от использованной концентрации активных функциональных групп на поверхности функционализированного оксида (таблица). Кроме того, тип используемого бифункционального линкера не оказал влияния на активность иммобилизованного фермента. С точки зрения увеличения чувствительности сенсоров в дальнейшем предпочтительнее использовать более короткий линкер [5]. Результаты АСМ-исследований морфологии полученных пленок фермента показали, что даже минимальные значения используемых концентраций МРТЕС являются достаточными для формирования плотной пленки из фермента на поверхности оксида кремния (рис. 2). Так, при концентрации МРТЕС 1% (рис. 2, а) от общего количества силанов в смеси пленка еще имеет незаконченный вид, но уже при концентрации 5% (рис. 2, б) достигается насыщение в плотности посадки белка, которое не изменяется вплоть до максимальной концентрации, используемой в эксперименте. Полученные данные свидетельствуют о том, что для успешной иммобилизации ферментов могут использоваться значительно более разбавленные растворы силанов (от 0,0015%).

**Иммобилизация фермента с использованием симметричного линкера.** Глутаровый альдегид является широко распространенным сшивающим агентом. Сшивка с использованием глутарового альдегида и прочих схожих коротких симметричных бифункциональных реагентов протекает с образованием оснований Шиффа [16]. При использовании такого подхода возможно сшивание молекул белка между собой, образование ассоциатов и побочных продуктов. Образующиеся азометиновые связи неустойчивы при подкислении, а их защита требует введения дополнительной стадии восстановления боргидридом натрия. Однако, несмотря на все недостатки, этот метод прост и в ряде случаев приносит хорошие результаты [17].

Глутаровый альдегид содержит на концах одинаковые альдегидные группы, которые реагируют

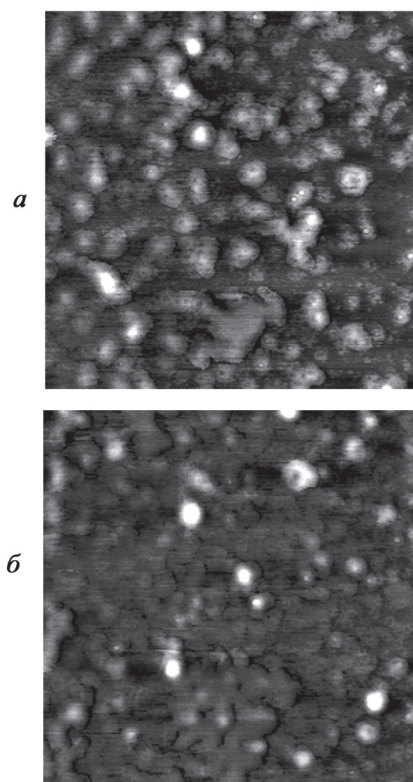


Рис. 2. АСМ-снимок поверхности оксида кремния после иммобилизации нитроредуктазы из *E. coli* при разной концентрации МРТЕС, %: а – 1; б – 5. Размер скана 1×1 мкм

с NH<sub>2</sub>-группами. Следовательно, на поверхности оксида кремния необходимо сформировать слой аминокрупп. Для этого мы использовали аминокпропилтриэтоксисилан (схема на рис. 3).

При иммобилизации фермента на поверхности SiO<sub>2</sub> с использованием глутарового альдегида активность нитроредуктазы из *E. coli* оказалась в 3,5 раза выше ( $[4,0 \pm 0,1] \times 10^{-4}$  Ед), чем в случае использования асимметричных линкеров. Более высокий выход при иммобилизации с использованием глутарового альдегида наблюдался также в работе [18]. Глутаровый альдегид может взаимодействовать не только с аминокгруппами, но и с сульфгидрильными группами, а также с остатками тирозина и гистидина [16]. Вероятно, в данном случае иммобилизация протекает не только по аминокгруппам, в результате чего молекулы фермента оказываются иначе ориентированными на поверхности SiO<sub>2</sub>, и молекулы субстрата встречают меньше стерических препятствий для входа в активный центр.

АСМ-исследования слайдов SiO<sub>2</sub> на каждой стадии процесса иммобилизации с использованием глутарового альдегида показали интересные результаты. Во-первых, стоит отметить, что шероховатость пленок АРТЕС, полученных предложенным способом (Ra = 0,169 нм), практически не отличается от шероховатости исходной поверхности кремния (в

**Активность иммобилизованной нитроредуктазы из *E. coli* при разной концентрации МРТЕС**

Содержание МРТЕС в смеси силанов, %	Активность × 10 <sup>4</sup> , Ед
1	1,1 ± 0,1
5	1,2 ± 0,3
10	1,1 ± 0,1
20	1,1 ± 0,2
40	1,4 ± 0,5
70	1,0 ± 0,2
100	1,0 ± 0,2

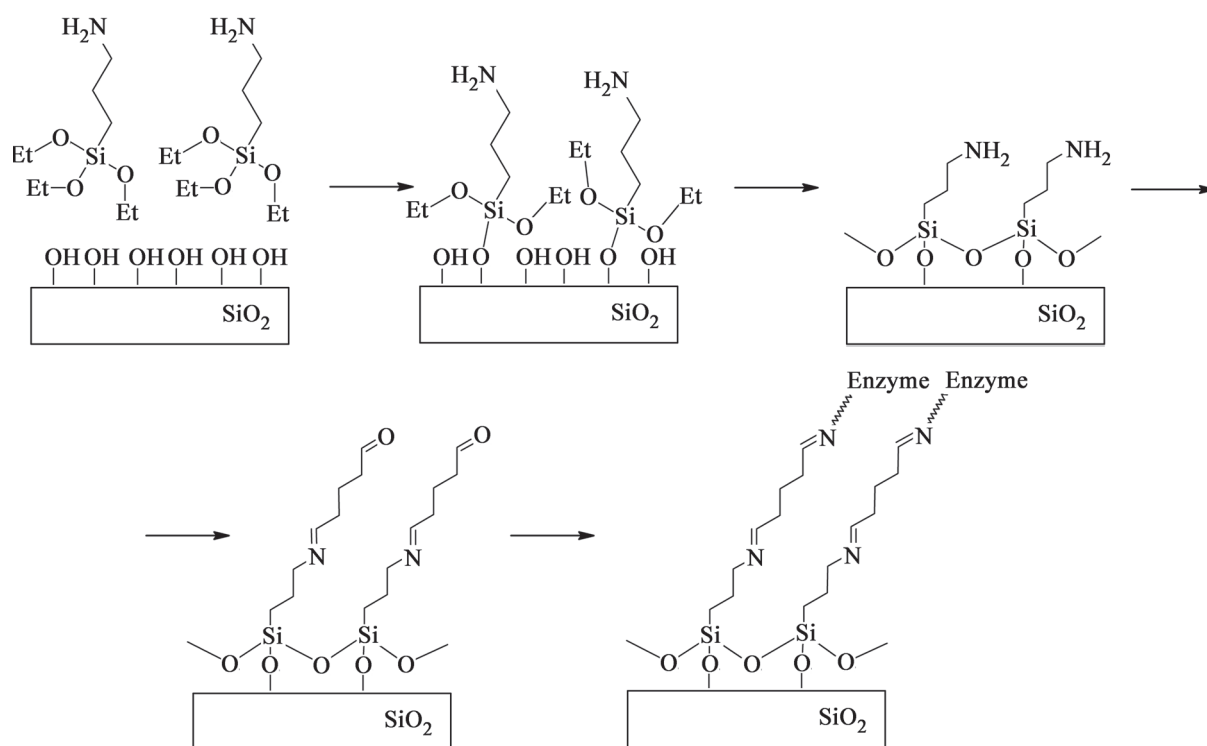


Рис. 3. Схема иммобилизации фермента через аминопропилтриэтоксисилан и глутаровый альдегид

среднем для кремниевой пластины параметр шероховатости составляет  $\sim 0,12$  нм). Это позволяет предположить, что на поверхности сформировался монослой APTES с меньшим количеством агрегатов, чем обычно при использовании данного реагента. Шероховатость поверхности незначительно возрастает при воздействии на нее глутарового альдегида ( $R_a = 0,312$  нм), однако при иммобилизации фермента наблюдается значительное увеличение  $R_a$  до  $0,770$  нм. Интересно, что типичное значение шероховатости пленок фермента, полученных при использовании MPTEES, составляет  $0,313$  нм, что однозначно указывает на формирование большого количества ассоциатов из-за кросс-сшивки фермента глутаровым альдегидом. Кроме того, увеличение шероховатости приводит к увеличению удельной поверхности, а следовательно, к большему количеству активного фермента на поверхности, что и подтверждается сравнением активности фермента, иммобилизованного с использованием MPTEES и APTES (рис. 4). Для методики с использованием глутарового альдегида была изучена зависимость выхода активности иммобилизованного фермента от его концентрации в диапазоне от 1 до 40 мкг/мл на третьей стадии функционализации. Концентрация фермента 10 мкг/мл является оптимальной для проведения иммобилизации на поверхности оксида кремния (рис. 5).

Таким образом, методика с использованием глутарового альдегида является более подходящей для иммобилизации нитроредуктазы из *E. coli* на по-

верхности оксида кремния. Оптимальная концентрация фермента составляет не менее 10 мкг/мл.

**Изучение стабильности иммобилизованного фермента.** Нитроредуктаза, иммобилизованная на поверхности оксида кремния, теряла половину своей активности за 12 дней при хранении в холодильнике, а при комнатной температуре фермент полностью инактивировался в течение 24 ч.

**Адаптация иммобилизации фермента при совмещении биосенсора с микрофлюидной системой доставки реагентов.** Конечная задача при разработке методики иммобилизации нитроредуктазы – функционализация ферментом поверхности транзисторов внутри канала микрофлюидной системы, созданной на поверхности ISFET-структуры и служащей для доставки реагентов непосредственно к чувствительной поверхности сенсора. Микрофлюидная система состоит из канала диаметром около 250 мкм и реакционной камеры объемом 1 мкл. В микрообъемах происходит очень быстрое испарение используемых органических растворителей, из-за чего начинают неконтролируемо изменяться условия реакций. В частности, возрастает концентрация воды в органическом растворителе. Все это приводит в конечном итоге к невоспроизводимым пленкам на поверхности. Поэтому использование органических растворителей становится нежелательным. Лучше всего проводить иммобилизацию в водных средах. Однако силаны в водных растворах чрезвычайно активны и очень быстро гидролизуются

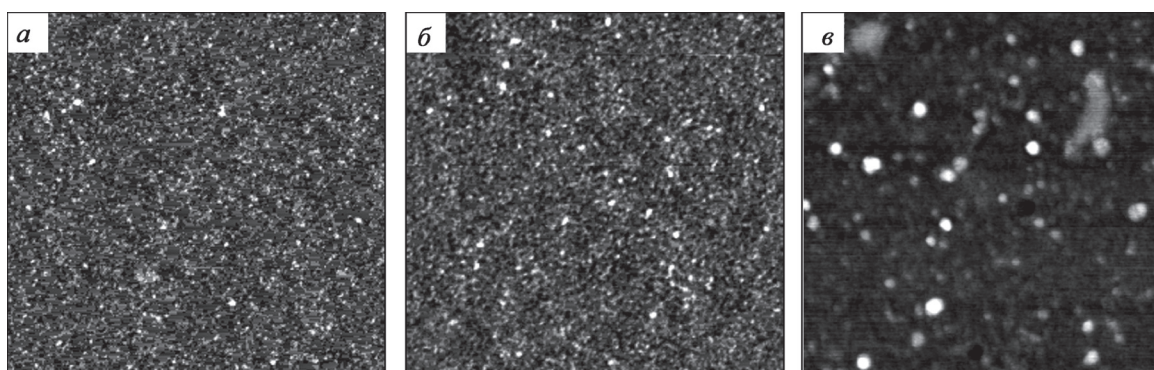


Рис. 4. АСМ-изображение поверхности оксида кремния на разных стадиях иммобилизации нитроредуктазой из *E. coli* через АРТЕС и глутаровый альдегид: *a* – поверхность после обработки АРТЕС (первая стадия иммобилизации); *б* – поверхность после обработки глутаровым альдегидом (вторая стадия); *в* – поверхность после инкубации с нитроредуктазой из *E. coli* (третья стадия). Размер скана 1×1 мкм

[7]. Поэтому аминопропилтриэтоксисилан был заменен на аминопропилсилатран. Силатраны выгодно отличаются от силанов способностью образовывать равномерные пленки на поверхности оксида кремния в водном растворе. Активность иммобилизованной нитроредуктазы при использовании силатрана была такой же, как и в случае силана. Другим важным моментом при иммобилизации в микроканале является концентрация фермента. Из-за заметного уменьшения соотношения объема реакционной смеси к площади поверхности, на которой требуется иммобилизовать фермент, концентрацию нитроредуктазы увеличили до 30 мкг/мл.

Разработанная методика была использована при изготовлении биосенсора для детекции взрывчатых веществ. Аналитическая микросистема, функционализированная нитроредуктазой из *E. coli*, проявляла отклик, возрастающий по мере увеличения концентрации тринитротолуола, 1,3-динитробензола и тетрила. Предел обнаружения

биосенсора составил  $5 \times 10^{-8}$  М для тринитротолуола и тетрила,  $5 \times 10^{-7}$  М – для 1,3-динитробензола.

Ковалентная модификация с использованием самособирающихся монослоев силанов использована для иммобилизации нитроредуктазы из *E. coli* на поверхности оксида кремния в ходе разработки биосенсора для детекции взрывчатых веществ. При использовании для функционализации поверхности меркаптопропилтриэтоксисилана и гетерофункционального линкера, содержащего малемидобензольную и сукцинимидную группы, длина линкера не оказывает влияния на результат иммобилизации. Изменение содержания SH-групп в пленке силана в диапазоне 1–100% также не приводит к изменению активности иммобилизованного фермента. Концентрация силана в ходе функционализации может быть существенно снижена без ухудшения плотности посадки фермента на поверхности оксида кремния. Использование аминопропилтриэтоксисилана и глутарового альдегида позволяет повысить активность нитроредуктазы из *E. coli* в 3,5 раза по сравнению с гетерофункциональными линкерами. Концентрация фермента при проведении иммобилизации через глутаровый альдегид должна составлять не менее 10 мкг/мл. Замена аминопропилтриэтоксисилана на соответствующий силатран позволяет проводить процесс иммобилизации в водной среде вместо органической. Разработанная методика была успешно использована при создании биосенсора для детекции взрывчатых веществ.

Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования научным и испытательным оборудованием «Функциональный контроль и диагностика микро- и наносистемной техники» на базе НПК «Технологический центр» за предоставление доступа к оборудованию для проведения АСМ-исследований

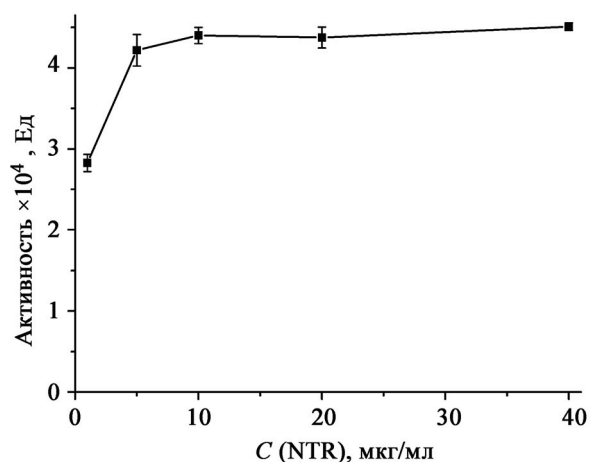


Рис. 5. Зависимость активности иммобилизованной нитроредуктазы из *E. coli* от концентрации фермента в ходе иммобилизации

Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (соглашение № 14.574.21.0114, уникальный идентификатор проекта № RFMEFI57414X0114).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sheldon R. A., van Pelt S. // Chem. Soc. Rev. 2013. Vol. 42. P. 6223.
2. Mross S., Pierrat S., Zimmermann T., Kraft M. // Biosens. Bioelectron. 2015. Vol. 70. P. 376.
3. Patel S. K. S., Kalia V. C., Choi J.-H., Haw J.-R., Kim I.-W., Lee J. K. // J. Microbiol. Biotechnol. 2014. Vol. 24. P. 639.
4. Deva Kumar E. T., Ganesh V. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2014. Vol. 174. P. 1043.
5. Lee C.-S., Kim S. K., Kim M. // Sensors (Basel). 2009. Vol. 9. P. 7111.
6. Vashist S. K., Lam E., Hrapovic S., Male K. B., Luong J. H. T. // Chem. Rev. 2014. Vol. 114. P. 11083.
7. Haensch C., Hoeppeener S., Schubert U. S. // Chem. Soc. Rev. 2010. Vol. 39. P. 2323.
8. Race P. R., Lovering A. L., Green R. M., Ossor A., White S. A., Searle P. F., Wrighton C. J., Hyde E. I. // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280. P. 13256.
9. Shlyakhtenko L. S., Gall A. A., Filonov A., Cerovac Z., Lushnikov A., Lyubchenko Y. L. // Ultramicroscopy. 2003. Vol. 97. P. 279.
10. Koder R. L., Miller A. // Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol. 1998. 1387. P. 395.
11. Fischer M. J. // Methods Mol. Biol. 2010. Vol. 627. P. 55.
12. Kim J., Cho J., Seidler P. M., Kurland N. E., Yadavalli V. K. // Langmuir. 2010. Vol. 26. P. 2599.
13. Kitagawa T., Aikawa T., Biochem J. // 1976. Vol. 79. P. 233.
14. Lim G., Hwang H. J., Kim J. H. // Anal. Biochem. 2011. Vol. 419. P. 205.
15. Bigdeli S., Talasaz A. H., Ståhl P., Persson H. H. J., Ronaghi M., Davis R. W., Nemat-Gorgani M. // Biotechnol. Bioeng. 2008. Vol. 100. P. 19.
16. Habeeb A. F. S. A., Hiramoto R. // Arch. Biochem. Biophys. 1968. Vol. 126. P. 16.
17. Saengdee P., Chairiratanakul W., Bunjongpru W., Sripumkhai W., Srisuwan A., Jeamsaksiri W., Hruanun C., Poyai A., Promptmas C. // Biosens. Bioelectron. 2014. Vol. 67. P. 134.
18. Singh A., Flounders A., Volponi J., Ashley C., Wally K., Schoeniger J. // Biosens. Bioelectron. 1999. Vol. 14. P. 703.

Поступила в редакцию 01.08.15

### OPTIMIZATION OF SILICON DIOXIDE SURFACE FUNCTIONALIZATION PROTOCOL FOR DESIGN OF RECEPTOR LAYER OF THE BIOSENSOR FOR DETECTION OF EXPLOSIVES

N.V. Komarova, M.S. Andrianova, M.I. Saveliev, A.E. Kuznetsov

(Scientific and Manufacturing Complex «Technological Center»)

The development of the receptor layer of the biosensor for detection of explosive compounds is described. Covalent modification was chosen for immobilization of *E. coli* nitroreductase on the gate oxide of ion-sensitive field effect transistor (ISFET) that was comprised of silicon dioxide. Self-assembled monolayer technique was used for immobilization. This method assumes the usage of different silanes and spacer molecules for activation of SiO<sub>2</sub> surface. Two different immobilization strategies were compared, one using asymmetric spacers (3-maleimidobenzoic acid N-hydroxysuccinimide ester and 4-(4-maleimidophenyl) butyric acid N-hydroxysuccinimide ester) and another using symmetric glutaric dialdehyde linker accompanied with appropriate silanes. For the first method, the dependence of functionalization efficiency on silane concentration was studied. The sufficient density of enzyme molecules on the surface of SiO<sub>2</sub> was reached at 0.0015% of silane concentration. The type of asymmetric linker had no influence on immobilization efficiency. The method implying glutaric dialdehyde resulted in higher activity of the immobilized enzyme. For this method, immobilization procedure was optimized. The method was adopted for immobilization on *E. coli* nitroreductase inside the channel of microfluidic system above ISFET surface. For this purpose (3-aminopropyl)triethoxysilane was changed to the corresponding silatrane and enzyme concentration was increased to 30 µg/ml. The optimized procedure was successfully used for the development of the biosensor for explosives detection.

**Key words:** enzyme, immobilization, self-assembled monolayers, biosensor.

**Сведения об авторах:** Комарова Наталья Владимировна – ст. науч. сотр. НПК «Технологический центр», канд. хим. наук (nat.v.kom@gmail.com); Андрианова Мария Сергеевна – науч. сотр. НПК «Технологический центр», канд. хим. наук (smariika1987@gmail.com); Савельев Михаил Иванович – науч. сотр. НПК «Технологический центр» (foesign@gmail.com); Кузнецов Александр Евгеньевич – начальник лаборатории интегральных биохимических наносенсоров НПК «Технологический центр» (kae@tcen.ru).