

Определение эффективности иммобилизации глюкозооксидазы на полупроводниковый трансдьюсер методами сканирующей зондовой микроскопии

А.В. Козловский, С.В. Стецюра

*ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», 410012, Саратов, Россия
kozlowsky@bk.ru*

В работе исследовались монослои глюкозооксидазы (GOx) на поверхности гибридных структур Si/SiO₂/полиэтиленимин методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). При помощи АСМ удалось определить влияние освещения и типа проводимости Si на поверхностную концентрацию иммобилизованных молекул GOx (N_{GOx}).

Determination of the glucose oxidase immobilization efficiency on a semiconductor transducer using scanning probe microscopy

A.V. Kozlowski, S.V. Stetsyura

Saratov State University, 410012, Saratov, Russia

The glucose oxidase (GOx) monolayer on the surface of Si/SiO₂/polyethyleneimine hybrid structures was studied by atomic force microscopy (AFM). Using AFM, the influence of illumination and a silicon substrate conductivity type on the surface concentration of immobilized GOx molecules (N_{GOx}) was determined.

Методы атомно-силовой микроскопии (АСМ) и Кельвин-зондовой силовой микроскопии (КЗСМ) наиболее часто используются для характеристики органических [1], в частности полимерных [2] и биологических [3] материалов. Также зондовые методы являются незаменимым инструментом для контроля поверхности гибридных и биосенсорных структур на основе твердой полупроводниковой подложки и органических компонентов (ферментов, ДНК, бактерии и т. д.) [4-5].

В данной работе исследовались монослои фермента глюкозооксидазы (GOx), нанесенного методом послойной адсорбции из раствора на поверхность структуры Si/SiO₂/полиэтиленимин (ПЭИ) при варьировании режимов адсорбции, а именно уровня освещенности пластины кремния в процессе нанесения молекул GOx.

Молекула GOx является димером и состоит из двух одинаковых субъединиц с молекулярной массой 80 kDa, каждая из частей содержит одну молекулу флавинадениндинуклеотида (ФАД), которая является активным центром фермента. В широком диапазоне pH раствора молекула GOx имеет эффективный отрицательный заряд. Размер молекулы: 6,0×5,2×7,7 nm³ [6]. Для иммобилизации GOx на поверхности монокристаллического кремния использовали буферный слой катионного полиэлектролита ПЭИ с молекулярной массой 25 kDa.

Рельеф поверхности полученных структур измерялся методом АСМ в полуконтактном режиме при помощи зондовой станции *NTEGRA Spectra* (НТ-МДТ). Использовались кантилеверы HA_NC/Pt с радиусом закругления зонда <30 nm. Анализ АСМ-изображений производился при помощи программы *Gwyddion 2.47*. По АСМ-сканам определялась также средняя поверхностная плотность N_{GOx} адсорбированных молекул GOx, исходя из размеров молекулы GOx и с учетом ограничений метода измерения. Полученные АСМ-изображения, а также профиль характерных неровностей показаны на Рисунке 1. Зависимость N_{GOx} от уровня освещенности пластин *n*-Si и *p*-Si в процессе адсорбции GOx показана на Рисунке 2.

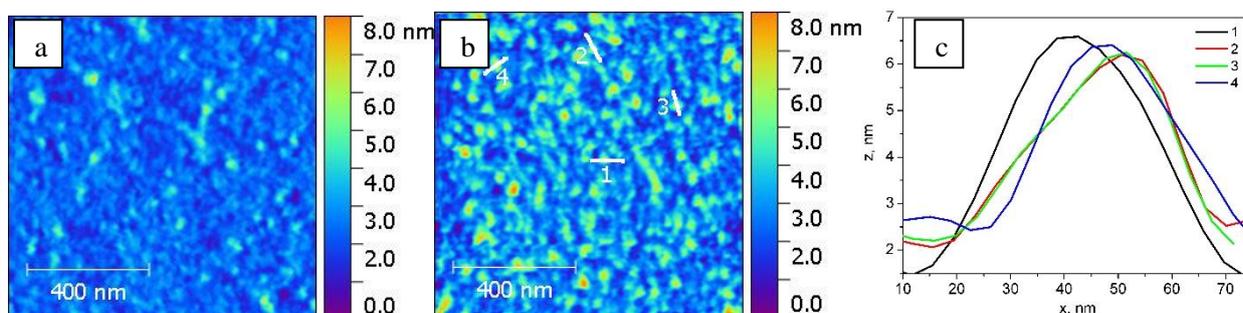


Рисунок 1. АСМ-изображения для структур $n\text{-Si}/\text{SiO}_2/\text{ПЭИ}/\text{GOx}$ после нанесения молекул GOx: (a) в темноте и (b) при освещении (22000 lx) пластины Si во время адсорбции, (c) профили рельефа поверхности вдоль линий на скане b.

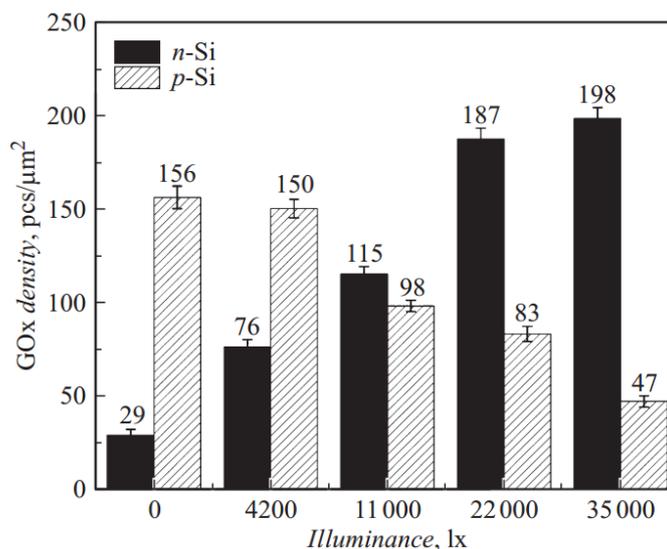


Рисунок 2. Изменение плотности иммобилизованных молекул N_{GOx} от уровня освещенности пластин $n\text{-Si}$ и $p\text{-Si}$.

Из сканов на Рисунке 1 и диаграммы на Рисунке 2 следует, что освещение существенно увеличивает число адсорбированных на $n\text{-Si}$ молекул GOx в указанном диапазоне освещенностей (почти в 7 раз при максимальном уровне освещенности по сравнению с темновой адсорбцией) и уменьшает адсорбцию GOx на $p\text{-Si}$ (более чем в 3 раза). Также следует отметить, что латеральный размер характерных неровностей составляет ~ 50 nm, а средняя высота неровностей $\sim 4,2$ nm, что отличается от истинных размеров молекулы GOx, т.е. наблюдаются так называемые эффекты «уширения профиля» и «занижения высот», что связано с малым размером молекулы фермента.

Таким образом, при помощи АСМ было получено, что влияние освещения подложки Si со слоем ПЭИ на скорость адсорбции и предельную концентрацию иммобилизованных молекул GOx более высокое при использовании в качестве подложки $n\text{-Si}$. Причем, поскольку скорость ферментативной реакции пропорциональна количеству молекул фермента, то при использовании $n\text{-Si}$ и освещении его в процессе адсорбции молекул GOx можно создавать ферментные сенсоры с более высоким быстродействием.

Исследования проведены при поддержке РФФИ (проект № 16-08-00524_a).

1. A.L. Domanski, et al., *Langmuir*, **28**, 13892–13899. (2012).
2. Z. Yenice, M. Karg, R. Klitzing, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 12893-12913. (2013).
3. Y.-L. Ong, A. Razatos, G. Geogiou, M.M. Sharma, *Langmuir*, **15**, 2719-2725 (1999).
4. И.Л. Волков и др., *Журнал структурной химии*, **50**(5), 999-1006 (2009).
5. I.V. Malyar, D.A. Gorin, S. Santer, S.V. Stetsyura, *Appl. Phys. Lett.*, **110**, 133104 (2017).
6. H.J. Hecht, H.M. Kalisz, J. Hendle, R.D. Schmid, D. Schomburg, *J. Mol. Biol.*, **229**(1), 153–172