

УДК 577.152.192.3

Влияние модификации поверхности наночастицами золота на биоэлектродокаталитические параметры иммобилизованной билирубиноксидазы

Д. В. Панкратов^{1,2}, Ю. С. Зейфман², А. В. Дударева³, Г. К. Панкратова¹, М. Е. Хлупова¹, Ю. М. Парунова², Д. Н. Зайцев³, Н. Ф. Баширова³, В. О. Попов^{1,2}, С. В. Шлеев^{1,2,3*}

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2

²Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123182, Москва, пл. Акад. Курчатова, 1

³Брянский государственный университет им. акад. И.Г. Петровского, 241036, Брянск, ул. Бежицкая, 14

*E-mail: shleev@inbi.ras.ru

Поступило в редакцию 14.12.2013

РЕФЕРАТ Приведены экспериментальные доказательства, подвергающие сомнению широко распространенное мнение о влиянии наночастиц на биоэлектродокаталитические параметры иммобилизованных ферментов. В результате сравнительного изучения биоэлектродокаталитических свойств грибной билирубиноксидазы, адсорбированной на поверхности золотых электродов, модифицированных золотыми наночастицами различного диаметра (5–60 нм), показано, что скорость прямого электронного переноса (средние рассчитанные стандартные константы скорости гетерогенного переноса $31 \pm 9 \text{ с}^{-1}$), а также биокаталитические свойства адсорбированного фермента (средние рассчитанные кажущиеся биоэлектродокаталитические константы $34 \pm 11 \text{ с}^{-1}$) не зависят от размера наночастиц, диаметр которых больше или сопоставим с размером фермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА билирубиноксидаза, биоэлектродокатализ, золотые наночастицы, прямой электронный перенос.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 3D – трехмерный (three-dimensional); A_{real} – реальная/электрохимическая площадь поверхности; CV – циклическая вольтамперограмма (cyclic voltammogram); ET – электронный перенос (electron transfer); DET – прямой электронный перенос (direct electron transfer); E_{T1}^0 – редокс-потенциал T1-центра фермента; k_0 – стандартная константа реакции гетерогенного электронного переноса; $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ – кажущаяся биоэлектродокаталитическая константа (apparent bioelectrocatalytic constant); MCO – голубая медьсодержащая оксидаза (blue multicopper oxidase); MvBOx – билирубиноксидаза из гриба *Myrothecium verrucaria*; AuNP_n – золотые наночастицы (gold nanoparticles) диаметром n нм; AuNP_n/Au – золотой электрод, модифицированный наночастицами с диаметром n, подвергшийся циклированию в серной кислоте (m-AuNP/Au) или без него (u-AuNP/Au); ThLc – лакказа из гриба *Trametes hirsuta*; PBS – фосфатно-солевой буфер (phosphate buffered saline); NHE – нормальный водородный электрод (normal hydrogen electrode); SEM – сканирующая электронная микроскопия (scanning electron microscopy); A_{spr} – максимум оптического поглощения; A_{450} – оптическое поглощение при длине волны 450 нм; j_{max} – максимальная плотность тока.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в ряде работ описан эффективный прямой электронный перенос (DET) различных ферментов (включая голубые медьсодержащие оксидазы (MCO)), иммобилизованных на поверхности наноструктурированных электродов, с использо-

ванием металлических и углеродных наночастиц, углеродных нанотрубок, графена и т.п. [1–3]. В качестве основного доказательства ускорения реакций DET в этих работах рассматривается повышение биоэлектродокаталитического тока при использовании наноструктурированных поверхностей, однако ко-

личественный сравнительный анализ DET на основе анализа вольтамперограмм, а также расчет стандартных констант реакций гетерогенного электронного переноса (k_0) не был проведен. Более того, даже в случае одного фермента, в частности лакказы из гриба *Trametes hirsuta* (ThLc), иммобилизованной на поверхности золота, получены противоречивые данные. Например, использование AuNP и нанопористого золота приводило к повышению DET [4], в то время как у модифицированных золотом нано/микроструктурированных кремниевых чипов с иммобилизованным на поверхности ферментом наблюдалась крайне низкая биоэлектрокаталитическая активность фермента в случае DET [5]. Ввиду того, что использование биоэлектродов, не имеющих наномодифицированной поверхности, приводит к крайне низкой скорости гетерогенного переноса, а иногда и к полному отсутствию DET, наиболее часто встречающееся объяснение «наносвязыванию» ферментов сводится к способствующей DET ориентации фермента на наноструктурированной поверхности.

Несмотря на то что возможную зависимость величины k_0 от размера металлических и углеродных наночастиц не изучали и в недавних работах (например, в работе [6]) продемонстрированы две противоположные зависимости биоэлектрокаталитического тока восстановления кислорода от диаметра AuNP на электродах, модифицированных MCO, по-прежнему считается, что размер AuNP, используемых для наномодификации электрода, является крайне важным фактором, определяющим ET в реакциях между редокс-ферментом и поверхностью электрода. В данной работе приведены экспериментальные результаты, доказывающие несостоятельность этой гипотезы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы и методы

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, NaCl, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, H_2O_2 , H_2SO_4 , NaBH_4 , цитрат натрия были получены из Sigma-Aldrich GmbH (США) и использовались без дополнительной очистки. Кислород был приобретен в AGA Gas AB (Швеция). Буферные и другие растворы готовили на деионизированной воде (18 МОм·см), полученной с использованием системы PURELAB UHQ II из ELGA Labwater (Великобритания). Все эксперименты проводили при комнатной температуре в PBS (pH 7.4), состоящем из 50 мМ раствора $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$, содержащего 150 мМ NaCl.

Препарат *MvVOx* получен как подарок от компании Amano Enzyme Inc. (Япония).

Электрохимические измерения осуществляли при помощи потенциостата/гальваностата $\mu\text{Autolab}$

Типе III/FRA2 от Metrohm Autolab B.V. (Нидерланды) с использованием трехэлектродной схемы с насыщенным каломельным электродом сравнения (242 мВ относительно нормального водородного электрода, NHE) и платиновой нитью как вспомогательным электродом.

Ультразвуковую обработку проводили с использованием ванны Ultrasonic Cleaner XB2 от VWR International Ltd. (Великобритания). SEM осуществляли на сканирующем электронном микроскопе высокого разрешения FEI Nova NanoLab 600 (Нидерланды). Спектрофотометрические исследования проводили на спектрофотометре УФ-видимой области PharmaSpec UV-1700 (Китай).

С целью изучения влияния размера AuNP на биоэлектрокаталитические свойства *MvVOx* были синтезированы наночастицы диаметром от 5 до 60 нм.

Синтез наночастиц золота заданного размера

AuNP с ожидаемым диаметром 5 нм (AuNP_5 , *рис. 1А*) были синтезированы по методике, описанной в работе [7]. 50 мл 250 мкМ раствора HAuCl_4 перемешивали в течение 1 мин при комнатной температуре, затем к исходному раствору добавляли 1111 мкл 38.8 мМ раствора цитрата натрия и перемешивали в течение еще 1 мин, после чего 555 мкл свежеприготовленного NaBH_4 с концентрацией 0.075 вес. % в 38.8 мМ растворе цитрата натрия приливали к реакционной смеси, после чего раствор перемешивали в течение 5 мин.

AuNP диаметром 20–60 нм (*рис. 1А*) были синтезированы с использованием цитрата натрия в качестве восстановителя. 50 мл 250 мкМ раствора HAuCl_4 нагревали до кипения при постоянном перемешивании, затем добавляли 750, 500 или 260 мкл раствора с массовой долей цитрата натрия 1% для получения AuNP размером 20, 40 и 60 нм (AuNP_{20} , AuNP_{40} и AuNP_{60}) соответственно. После добавления цитрата натрия смесь выдерживали в течение 10 мин без нагревания при постоянном перемешивании.

Размер полученных наночастиц оценивали спектрофотометрически в соответствии с методикой, описанной в работе [7], используя длину волны в максимуме оптического поглощения (A_{spr} , *рис. 1Г*). Для AuNP размером менее 35 нм диаметр рассчитывали из отношения A_{spr}/A_{450} .

Размер наночастиц 20–60 нм дополнительно определяли при помощи SEM. Образцы для микроскопии получали нанесением небольшого объема AuNP из разбавленных коллоидных растворов на поверхность плоских золотых электродов (*рис. 1Б*). Следует специально отметить, что структура поверхности электродов, использованных в дальнейших исследованиях, принципиально отлична от представленной на *рис. 1* ввиду значительно большего количества

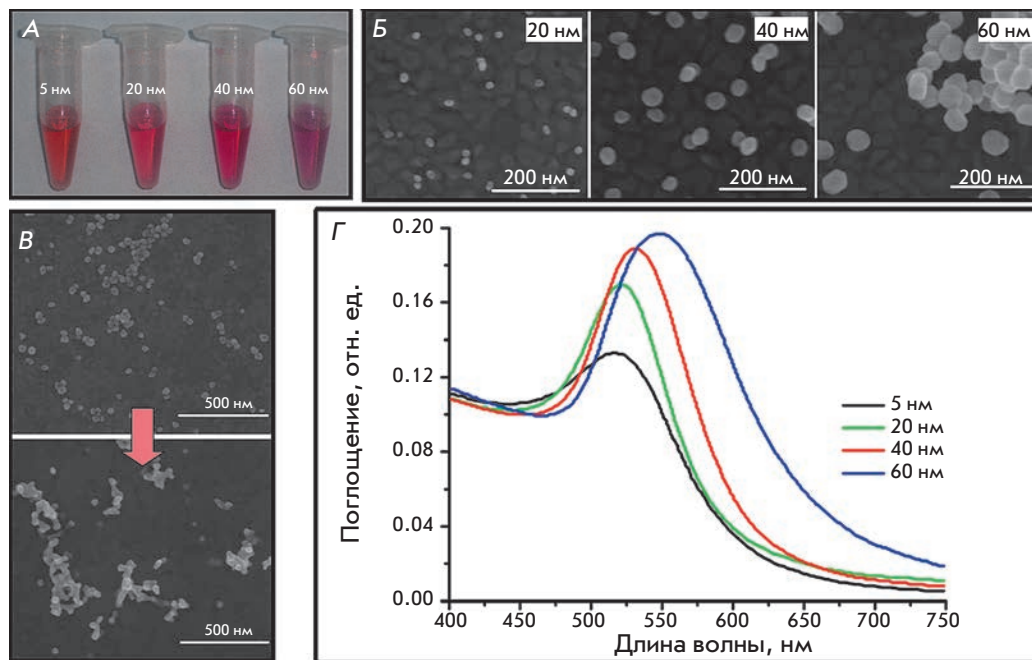


Рис. 1. А – фотография коллоидных растворов синтезированных AuNP. Б – SEM-изображения образцов AuNP/Au. В – SEM-изображение AuNP₄₀/Au до (вверху) и после (внизу) двух циклов обработки в H₂SO₄. Г – спектры оптического поглощения суспензий AuNP различного диаметра

наносимых AuNP и изменения поверхности вследствие обработки в серной кислоте (см. ниже) и может использоваться только для оценки размера синтезированных AuNP.

Результаты анализа размера наночастиц, полученные независимыми методами, представлены в табл. 1.

Из рис. 1Б,Г можно сделать вывод, что непосредственное определение размера AuNP методом SEM дает наиболее точные и непротиворечивые данные с возможностью статистической оценки распределения частиц по размерам. Однако данный метод имеет свои ограничения по чувствительности, в частности, в нашем случае не представлялось возможным оценить размер наночастиц менее 10 нм.

Все полученные растворы AuNP, за исключением AuNP диаметром 5 нм, концентрировали центрифугированием при 10 000 g в течение 30 мин. 95% супернатанта отбиралось, преципитат AuNP ресуспензировался ультразвуковой обработкой. Концентрирование наночастиц диаметром 5 нм с помощью предложенного метода осуществить не удалось, поэтому в дальнейших экспериментах использовали разбавленный раствор.

Очистка золотых электродов и их модификация AuNP

Поликристаллические золотые дисковые электроды от компании Bioanalytical Systems (США) с геометрической площадью поверхности 0.031 см² механически очищали полировкой на бумаге Microcloth (Buehler,

Великобритания) в суспензии оксида алюминия с размером частиц 0.1 мкм, купленной в Struers (Дания), до получения зеркальной поверхности. Далее электроды промывали деионизированной водой и электрохимически очищали циклированием в 0.5 M H₂SO₄ в диапазоне потенциалов от -0.1 до +1.9 В относительно NHE в течение 20 циклов со скоростью развертки потенциала 0.1 В · с⁻¹, промывали водой и высушивали в потоке воздуха.

Затем 5 мкл раствора в случае концентрированных суспензий и 6 мкл в случае суспензии AuNP с диаметром 5 нм (AuNP₅) наносили на поверхность очищенного золотого электрода, после чего модифицированный электрод высушивали при комнатной

Таблица 1. Сравнительный анализ размеров синтезированных AuNP, определенных различными методами

	Диаметр AuNP, нм		
	ожидаемый	определенный спектрофотометрически	определенный из данных SEM
20		16	19 ± 2
40		42–51	38 ± 5
60		77	59 ± 5

температуре. Процедуру модификации AuNP повторяли 2 раза для концентрированных суспензий наночастиц и 5 раз в случае AuNP₅. Полученные электроды циклировали в 0.5 М H₂SO₄ в диапазоне потенциалов от 0.0 до +1.9 В относительно ННН в течение двух циклов во избежание десорбции и/или агломерации наночастиц на поверхности (рис. 1В) со скоростью развертки потенциала 0.1 В·с⁻¹, промывали водой и высушивали. Электрохимически активную (реальную) площадь поверхности электродов (A_{real}) рассчитывали в соответствии с [8], принимая количество электричества, необходимое для восстановления оксида золота при электрохимическом циклировании в заданных условиях, равным 390 ± 10 мкКл·см⁻²[9].

Результаты расчета A_{real}, представленные в табл. 2, свидетельствуют об отсутствии прямой зависимости A_{real} от размера AuNP, использованных для модификации поверхности, что косвенно подтверждает полученные ранее результаты [10] о формировании неупорядоченной трехмерной структуры в результате многократного циклирования AuNP/Au электрода в 0.5 М H₂SO₄. В связи с этим в дальнейших экспериментах использовали два типа AuNP/Au электродов: подвергнутых обработке H₂SO₄ (m-AuNP/Au) и без предварительного циклирования (u-AuNP/Au). A_{real} для u-AuNP/Au электродов принимали равной A_{real} для m-AuNP/Au образцов.

Биомодификацию поверхности AuNP/Au электродов осуществляли путем прямой адсорбции фермента в течение 20 мин из раствора MbVOx с концентрацией белка 0.25 мг · мл⁻¹. Поверхностную концентрацию фермента принимали равной 3.0 пмоль·см⁻².

Значения k₀ и k_{cat}^{app} рассчитывали с использованием пакета программ MathCAD 14 по уравнению:

$$j = \frac{j_{\max}}{1 + \exp\left[\frac{F}{RT}(E - E_{T1}^{0'})\right] + \frac{k_5}{k_0} \exp\left[\frac{\alpha F}{RT}(E - E_{T1}^{0'})\right]},$$

$$k_5 = \frac{k_{cat}[O_2]}{K_M + [O_2]}$$

Кинетическая схема функционирования фермента, использованная для вывода уравнения, представлена в работе [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные биоэлектроды помещали в насыщенный кислородом PBS с последующей записью CV со скоростью вращения электрода 1500 об·мин⁻¹ для устранения возможных диффузионных ограни-

Таблица 2. Зависимость реальной площади поверхности от размера наночастиц

Диаметр AuNP, нм	Реальная площадь поверхности, см ⁻²
5	0.21 ± 0.01
20	1.40 ± 0.01
40	1.25 ± 0.05
60	1.23 ± 0.03

чений (рис. 2А). Выраженный биоэлектрокаталитический отклик с начальным потенциалом электровосстановления кислорода около 0.75 В зафиксирован для всех использованных электродов. Как видно из рис. 2Б,В, достаточно близкие величины j_{max} получены как в случае биомодифицированных m-AuNP/Au (31.4 ± 5.9 мкА·см⁻²), так и u-AuNP/Au (43.4 ± 5.6 мкА·см⁻²) электродов.

С учетом полученных данных были рассчитаны значения k₀ (31 ± 9 с⁻¹) и k_{cat}^{app} (34 ± 11 с⁻¹). Результаты расчетов представлены на рис. 2Г. Видно, что рассчитанные величины как k₀, так и k_{cat}^{app}, имеют сходные значения независимо от диаметра использованных AuNP и от типа электрода. Сходство величин констант для электродов на основе m-AuNP/Au и u-AuNP/Au свидетельствует о том, что допущение об идентичности реальной площади поверхности (при различной структуре) для обоих типов образцов не вносит критической погрешности в расчеты. Завышенное значение констант в случае u-AuNP/Au свидетельствует о немного большей площади поверхности данных электродов по сравнению с m-AuNP/Au, что объясняется отсутствием агломератов AuNP (рис. 1В), приводящим к уменьшению реальной площади. Выявленные изгибы кривых зависимости констант от размера AuNP, наблюдаемые при использовании m-AuNP/Au, могут быть обусловлены изменением поверхности в результате формирования различных 3D-структур в ходе обработки электродов в H₂SO₄. Поведение фермента на подобных разнородных поверхностях не описывается полностью единой теорией, использованной в данной работе для расчета биокаталитических параметров, без введения дополнительных поправок. Более того, образование 3D-агломератов также приводит к погрешности при использовании единой величины поверхностной концентрации фермента (3.0 пмоль·см⁻²) для всех биоэлектродов на основе m-AuNP/Au, чем также можно объяснить форму кривых. Однако экспериментальные данные и результаты моделирования позволяют с достаточной степенью уверенности

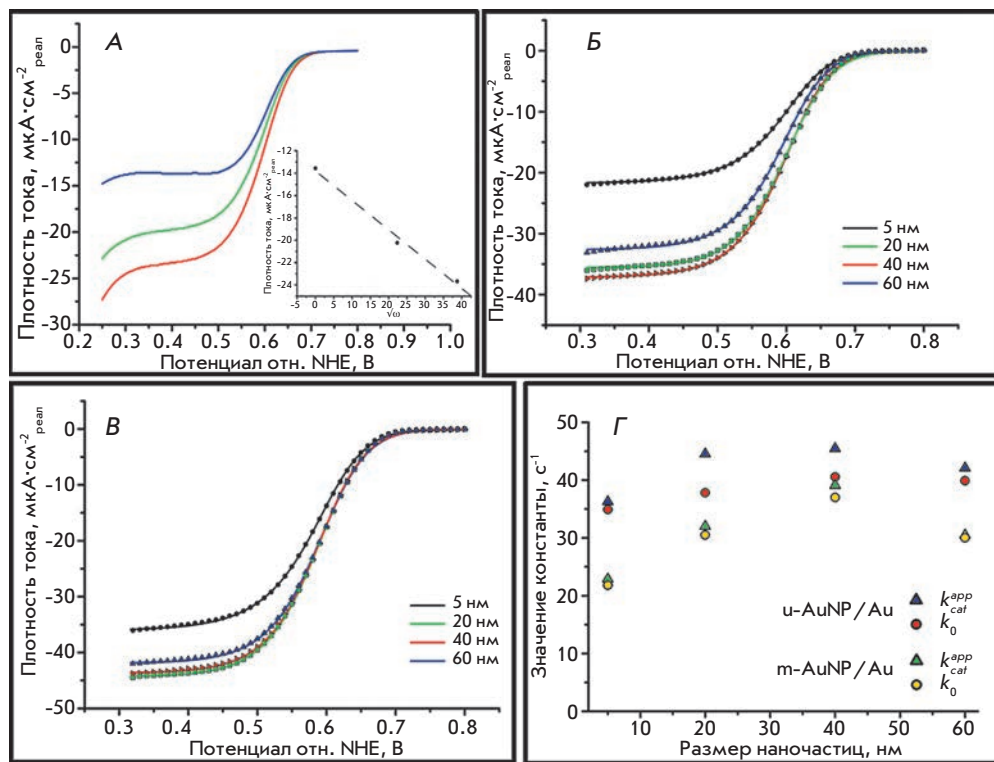


Рис. 2. А – катодная часть CV биомодифицированных $m\text{-AuNP}_{20}/\text{Au}$ электродов, полученная при различных скоростях вращения, $\text{об}\cdot\text{мин}^{-1}$: 0 (синий), 500 (зеленый) и 1500 (красный). Вставка – зависимость плотности тока при 0.35 В от $\omega^{1/2}$. Б, В – катодная часть CV $Mv\text{VOx}$ -модифицированных $m\text{-AuNP}/\text{Au}$ (Б) и $u\text{-AuNP}/\text{Au}$ (В) на основе AuNP различного диаметра. Г – зависимость рассчитанных значений биоэлектродокаталитических параметров от размера AuNP. Условия для всех CV: насыщенный кислородом PBS, скорость развертки потенциала – $20 \text{ мВ}\cdot\text{с}^{-1}$, второй цикл

утверждать, что биоэлектродокаталитические характеристики $Mv\text{VOx}$, иммобилизованной на AuNP/Au -поверхности не зависят от диаметра наночастиц, а полученное во многих предыдущих работах увеличение электродокаталитических токов биоэлектродов при их модификации наночастицами различного размера связано, скорее всего, с увеличением геометрической площади поверхности, а не с ускорением реакций DET или увеличением биоэлектродокаталитических констант иммобилизованных ферментов.

ВЫВОДЫ

В результате проделанной работы экспериментально показано отсутствие зависимости биоэлектродокаталитических параметров $Mv\text{VOx}$, иммобилизованной

на поверхности AuNP/Au , от размера наночастиц. Однако стоит отметить, что полученные нами результаты не могут быть экстраполированы на другие нанобиомодифицированные поверхности, например другие наночастицы и редокс-ферменты. В частности, особый интерес представляет изучение влияния наночастиц с диаметром, не превышающим размер фермента, которые могут способствовать электронному переносу между ферментом и поверхностью электрода. Подобные эксперименты позволят получить более полную картину влияния наночастиц на биоэлектродокаталитические параметры оксидоредуктаз. ●

Работа поддержана РФФИ
(грант № 12-04-33102-мол-а-вед).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Murata K., Kajiya K., Nakamura N., Ohno H. // *Energy & Environmental Sci.* 2009. V. 2. № 12. P. 1280–1285.
- Dagys M., Haberska K., Shleev S., Arnebrant T., Kulys J., Ruzgas T. // *Electrochem. Comm.* 2010. V. 12. № 7. P. 933–935.
- Pankratov D.V., Zeifman Y.S., Morozova O.V., Shumakovich G.P., Vasil'eva I.S., Shleev S., Popov V.O., Yaropolov A.I. // *Electroanalysis.* 2013. V. 25. № 5. P. 1143–1149.
- Salaj-Kosla U., Poller S., Schuhmann W., Shleev S., Magner E. // *Bioelectrochemistry.* 2013. V. 91. P. 15–20.
- Ressine A., Vaz-Dominguez C., Fernandez V.M., De Lacey A.L., Laurell T., Ruzgas T., Shleev S. // *Biosensors & Bioelectronics.* 2010. V. 25. № 5. P. 1001–1007.
- Gutierrez-Sanchez C., Pita M., Vaz-Dominguez C., Shleev S., De Lacey A.L. // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. V. 134. № 41. P. 17212–17220.
- Haiss W., Thanh N.T.K., Aveyard J., Fernig D.G. // *Anal. Chem.* 2007. V. 79. № 11. P. 4215–4221.
- Murata K., Kajiya K., Nukaga M., Suga Y., Watanabe T., Nakamura N., Ohno H. // *Electroanalysis.* 2010. V. 22. № 2. P. 185–190.
- Trasatti S., Petrii O.A. // *Pure Appl. Chem.* 1991. V. 63. № 5. P. 711–734.
- Wang X., Falk M., Ortiz R., Matsumura H., Bobacka J., Ludwig R., Bergelin M., Gorton L., Shleev S. // *Biosensors & Bioelectronics.* 2012. V. 31. № 1. P. 219–225.
- Climent V., Zhang J.D., Friis E.P., Østergaard L.H., Ulstrup J. // *J. Phys. Chem. C.* 2012. V. 116. № 1. P. 1232–1243.