© **Коллектив авторов**, 2013
УДК 616-074:577.2'1

МЕТОДЫ ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИИ ПОВЕРХНОСТИ СЕНСОРОВ БИОЛОГИЧЕСКИМИ МОЛЕКУЛАМИ

Н.Е. Маслова, кандидат физико-математических наук, **Т.С. Крылова**, **М.Я. Гараева**, **Д.А. Мамичев**, кандидат физико-математических наук

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», НБИКС-Центр, Москва

E-mail: dorothy@mail.ru

Биосенсоры широко используются для проведения биохимических анализов. Уникальной их особенностью является высокая специфичность биораспознающего элемента, позволяющая с высокой точностью проводить количественный анализ сложных аналитов и определять ультрамалые концентрации определенных молекул. Данный обзор посвящен методам иммобилизации белка на поверхности сенсора, обеспечивающим сохранение активности высаженных молекул, широкий диапазон температур, давлений и значений pH и хорошую воспроизводимость свойств сенсора при серийном производстве.

Ключевые слова: *иммобилизация, молекулы белков, биосенсор, биохимический анализ, адсорбция, сшивка, ковалентное связывание, капсулирование*

METHODS OF THE SENSOR SURFACE FUNCTIONALIZATION BY BIOLOGICAL MOLECULES

N.E. Maslova, T.S. Krylova, M.Ya. Garaeva, D.A. Mamichev

National research centre «Kurchatov institute», Moscow

There are many applications of biosensors in biochemical analysis. High specifity of biorecognizing element that allows to carry out a quantitative analysis of complex analytes with high accuracy and to detect ultrasmall concentration of the certain molecules is an unique biosensor feature. The methods of protein immobilization on the sensor surface which provide to save the molecule activity, wide range of temperatures, pressures and pH values and reproducibility of sensor properties are discussed in this review.

Key words: *protein immobilization, protein, biosensor, biochemical analysis, adsorption, cross-link, covalent binding, capsulation*

Биосенсоры находят все более широкое применение в ряде отраслей науки, промышленности, сельского хозяйства, медицины и здравоохранения, поскольку позволяют быстро проводить не только качественный, но и количественный анализ сложных многокомпонентных смесей веществ [4, 22].

Биосенсоры состоят из 3 компонентов: системы распознавания, преобразователя первичного сигнала (трансдьюсера) и системы сбора и обработки данных. Как правило, в качестве биораспознающего элемента используют ферменты и другие специфические биологические объекты – антитела или антигены, отдельные клетки, микроорганизмы, срезы тканей – в иммобилизованном состоянии, обладающие способностью к селективному взаимодействию с аналитом. Элемент, отвечающий за биологическое распознавание, должен находиться в прямом контакте с преобразователем, посредством которого химическое или биологическое взаимодействие преобразуется в детектирующий сигнал. Система сбора и обработки данных служит для усиления, анализа сигнала и отображения результатов [4, 20, 34].

Уникальной особенностью биосенсоров является высокая специфичность биораспознающего элемента, позволяющая с высокой точностью проводить количественный анализ сложных аналитов и определять ультрамалые концентрации определенных молекул [2].

Данный обзор посвящен методам иммобилизации распознающего элемента на поверхности трансдьюсера. При этом к современным и высокотехнологичным биосенсорам предъявляется ряд условий, которым они должны удовлетворять. Иммобилизованный биологический материал должен сохранять активность как можно дольше; перенос молекул аналита к распознающему элементу не должен быть затруднен; метод иммобилизации должен быть применим в достаточно широких диапазонах температур, значений pH и давлений и обеспечивать хорошую воспроизводимость при серийном производстве сенсоров [4].

Выделяют 5 основных методов иммобилизации белков на поверхности [4, 34, 36]: адсорбция, включение в полимер, сшивка, ковалентное связывание и капсулирование или изоляция с помощью мембран.

АДСОРБЦИЯ

Первые методы биофункционализации поверхности металлов для биоаналитических приложений были основаны на простом принципе физической адсорбции белков на активной металлической поверхности [15]. Однако исследования показали, что необходим более совершенный подход, чтобы учесть изменения, происходящие при адсорбции молекул, которые могут приводить к существенной модификации биологических молекул. Как правило, используемые металлические подложки, или наноструктуры на основе золота и серебра, обладают высокой способностью к спонтанному связыванию белков и других молекул. Однако такое «пассивное» образование связи с металлическими наноструктурами приводит к снижению биоактивности адсорбируемых молекул. Как и в случае со связыванием антител в иммуноферментном твердофазном анализе, после их адсорбции на пластиковые поверхности наблюдается снижение уровня на 2–10% от общего их числа [16].

Адсорбция – наиболее простой метод; она практически не требует подготовки компонентов сенсора и использования специальных химических реагентов. При физической адсорбции частицы удерживаются на подложке под действием сил Ван-дер-Ваальса, которые по своей природе делятся на диполь-дипольные, индукционные и дисперсионные взаимодействия, а также под действием водородных и ионных связей. Полученные методом адсорбции элементы обычно характеризуются низкой чувствительностью и существенной зависимостью от температуры и pH. Низкая чувствительность элементов, полученных адсорбцией белков, объясняется тем, что при адсорбции меняется конформационное состояние макромолекулы или блокируются ее активные центры. Кроме того, биологический материал может десорбироваться, уменьшая чувствительность системы и загрязняя раствор. Методом адсорбции пользуются в основном на стадии исследований и для производства дешевых одноразовых элементов.

Обработка поверхности металла перед иммобилизацией позволяет выявить реакционноспособные группы для каждого конкретного взаимодействия распознающего вещества с трансдьюсером. Существует большое число способов обработки поверхности металла перед иммобилизацией. Наиболее часто используемые методы основаны на концепции молекулярной самоорганизации тиолов или молекул дисульфидов на поверхности металла. Спонтанное формирование слоев органических дисульфидов на золоте показано в работе [27] в рамках изучения моделей поверхностей. Образующийся монослой приводит к строгому упорядочиванию атомов серы, связанных с металлом посредством сил притяжения Ван-дер-Ваальса между алкильными группами. Итоговый монослой с поразительной длиной цепи представляет собой плотно упакованную и обладающую высокой стабильностью структуру, ориентированную по нормали к металлической поверхности (рис. 1).

Эти нанометровые слои являются коммерчески доступными и могут быть синтезированы относительно просто [35]. Первые самоорганизующиеся монослои для биосенсоров описаны в конце 80-х годов и изначально были разработаны для коммерческих биосенсоров [5, 18]. Такие слои могут реагировать, образуя связи с различными молекулами или образовывать в дальнейшем различные химические связи для более сложной модификации поверхности.

Возможность присоединять различные функциональные группы к алкиловым тиолам создает высокую степень пластичности поверхности. В последние годы широко исследовались различные способы покрытия поверхности [6, 28, 35]. Например, в ранних исследованиях [5, 18] предполагалось, что тиоловое окончание придает поверхности гидрофильный характер, активно связывая при этом различные молекулы с трансдьюсером.

Данный способ получил широкое применение в различных областях жизнедеятельности человека. Так, был изготовлен [26] биосенсор на основе бактериофагов, иммобилизованных на поверхность кварцевых микровесов с помощью физической адсорбции для обнаружения β-галактозидазы из кишечной палочки.

Одним из интенсивно развивающихся направлений современной биотехнологии является иммобилизация высокомолекулярных биологически активных веществ (ВБАВ) в нано- и микрообъекты, такие, как липосомы, мицеллы, микро- и наночастицы (капсулы, сферы). Такого рода системы используются в различных областях промышленности (в том числе в каталитических целях) и медицины (в качестве систем направленной доставки и контролируемого высвобождения лекарственных препаратов) [1, 12].

ВКЛЮЧЕНИЕ В ПОЛИМЕР

Включение биологического материала в полимерную матрицу является фактически универсальным методом, применимым для разных типов распознающих элементов. Обычно используются такие полиме-

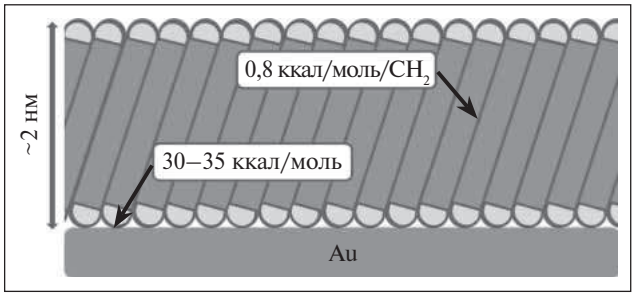

Рис. 1. *Схематическое изображение структуры самоорганизующегося монослоя на золотой подложке*

ры, как полиметилметакрилат (ПММА) [8], крахмал, нейлон, желатин, коллаген и некоторые другие. Если матрица состоит из синтетического полимера, его получение проводится в присутствии биологического материала, обычно добавляется сшиватель, чтобы отдельные полимерные нити объединились в 3-мерную сетку. При этом биологически активные молекулы оказываются захваченными внутрь полимера. Бесспорным достоинством этого метода является его универсальность, однако его недостаток в том, что сетка затрудняет диффузию и мешает проникновению аналита. Кроме того, если включаемые в сетку молекулы не связаны с ней химически, они могут диффундировать из нее через поры.

Даже если гладкая поверхность подложки сделана гидрофильной, ее свойства могут вызывать денатурацию или снижение активности белков [31]. При создании ферментативных электрохимических сенсоров иногда используют метод электрополимеризации. При этом на электроде создается проводящий гель (например, из декстрана) с включенными в него белками. Декстран состоит преимущественно из глюкозы, обеспечивающей высокую эластичность и растворимость в воде. Иммобилизация производится посредством эпоксидной модификации конечного гидроксила самоорганизующегося слоя и последующей ядерной реакции в декстране в присутствии алкалинов [5, 17, 18] (рис. 2).

Поверхность может быть впоследствии активирована подходящими линкерами для дальнейшей иммобилизации. Выбирая различные размеры декстрана (от 10 тыс. до более чем 1 млн Да), можно сформировать поверхность, удовлетворяющую необходимым требованиям. Слой, подобный гидрогелю, обеспечивает высокую гидрофильность окружения. Основанный на глюкозе полимер обладает высокой степенью сродства для ковалентной иммобилизации белков, что обеспечивает его эффективность при взаимодействии с большим числом химических веществ [19, 21].

Связывание звеньев полимеров декстрана с поверхностью сенсора обеспечивает открытую структуру, на которой иммобилизованные молекулы обладают высокой степенью биоактивности гидратации слоя. Этот способ позволяет получить очень хорошее согласование между данными, в отличие от результатов, полученных на платформах, использующих в качестве детектирующего метода явление плазмонного поверхностного резонанса (ППР), и методами, использующими различные растворы [9].

В качестве альтернативы декстрану могут быть рассмотрены другие гидрофильные молекулы [5]. Например, производные поливинилового спирта и полиакриловой кислоты подходят для обнаружения ППР-сигнала [10]. Поли-L-лизин используется для биосенсоров, применяемых для изучения ДНК благодаря большому положительному заряду. Привлекают внимание обработанные золотые поверхности с самоорганизующимися монослоями, используемые в дальнейшем для модификации посредством тиоловых групп [11].

СШИВКА

В случаях, когда молекулы биологического материала связаны между собой или с опорной сеткой, говорят о методе сшивки. Фактически сшитые распознающие молекулы могут использоваться без подложки, если обладают хорошими механическими характеристиками. Тем не менее сшивка обычно используется в сочетании с другими методами. Например, она может стабилизировать элементы, полученные адсорбцией. Для сшивки обычно используются бифункциональные агенты, типичным примером сшивателя является глутаровый альдегид.

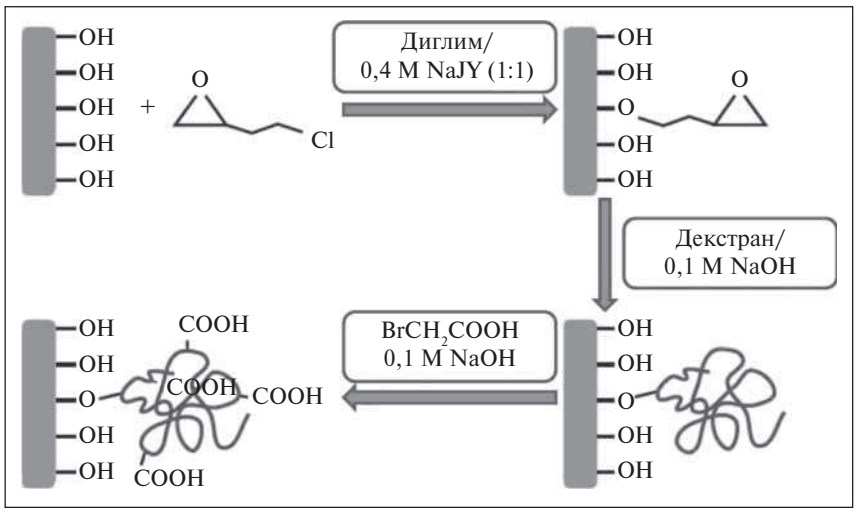

Рис. 2. *Синтез покрытой карбоксиметиловым декстраном поверхности сенсора*

Некоторые белки являются нестабильными и могут деградировать после иммобилизации на поверхность сенсора, даже если процесс иммобилизации прошел эффективно. Например, ВИЧ-протеаза со временем разлагается на составляющие ее мономеры, что приводит к постепенному уменьшению молекулярной массы на поверхности сенсора, а это затрудняет снятие кинетик взаимодействия, поскольку вклад в анализ вносят и маленькие молекулы. Проведение после иммобилизации процедуры активации или поперечной сшивки с EDC/NHS позволяет достигнуть стабилизации такого слоя. Использование поперечной сшивки определяется

эмпирически для каждого конкретного процесса иммобилизации; данный процесс не должен влиять на активность белка [3, 23].

Рассмотрена стабилизация в процессе иммобилизации [7]; в работе протеинкиназа p38α и GSK3β были иммобилизованы с помощью связывания через аминогруппу в присутствии ингибитора. Такая процедура иммобилизации приводила к формированию более стабильного слоя биомолекул на поверхности сенсора с гораздо большей степенью активности и связывания по отношению к соответствующим биомолекулам-партнерам (рис. 3).

КОВАЛЕНТНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ

Метод ковалентного связывания является наиболее распространенным в различных приложениях. Как следует из названия, он предполагает создание ковалентной связи между биоматериалом и подложкой. Выбор химических реагентов для его реализации зависит от типа связываемых молекул и материала подложки. Обычно метод реализуется в 3 этапа: очистка и модификация поверхности подложки, т.е. формирование на ней слоя из необходимых функциональных групп, затем – нанесение биоматериала и, наконец, удаление несвязанных молекул посредством промывания. Очевидно, что последовательность химических реакций должна быть выбрана так, чтобы связи, сформированные на ранних этапах, сохранялись на более поздних.

Ковалентное связывание белков обычно осуществляется через функциональные группы аминокислот, не влияющих на ферментативную активность. Чтобы защитить в ходе реакции активный участок фермента, ее проводят в присутствии субстрата.

Главные достоинства метода ковалентного связывания состоят в том, что, с одной стороны, он обеспечивает надежную связь биоматериала с подложкой, а с другой – позволяет создавать сенсоры с длительным временем жизни [4].

Различные функциональные группы могут быть закреплены на поверхности, делая возможным образование стабильных связей с другими подходящими функциональными группами. Такое внедрение может включать активацию 1 или 2 функциональных групп, которые в результате преобразуются в более реакционноспособную форму. В частности, используемые белки также изначально нуждаются в подготовке при относительно мягких условиях и в водном растворении, что происходит при определенных условиях.

Возможность того, что на поверхности сенсора будет прицеплена функциональная группа, весьма привлекательна как основная стартовая поверхность для использования с целым рядом связующих элементов. Покрытие поверхности карбоксиметиловым декстраном, описанное в предыдущем разделе, включает в качестве функциональной группы радикал карбоновой кислоты, что может использоваться как для образования прямой связи, так и для обмена функциональными группами. Карбоксильные группы могут вступать в прямую реакцию с аминогруппами или участвовать в реакциях замещения с тиолами, альдегидами, солями карбоновой кислоты и процедурах захвата биотина.

Следует отметить, что самым широко используемым способом иммобилизации белка является обработка поверхности карбоксиметиловым декстраном с последующим связыванием с помощью аминов [24].

Распространен подход, включающий связывание карбоксильных групп на поверхности сенсора с реакционноспособными нуклеофильными группами. Наиболее часто используемый нуклеофил – аминогруппа в радикале лизина, но часто используются также гидроксильные группы. Карбоксильные группы легко образуют связи с декстраном или другими гидроксилсодержащими слоями на поверхности. Была изучена [13] оптимизация связывания белков на поверхности сенсора посредством карбоксиметила.

Образование активных сложных эфиров может происходить при различных условиях, зависящих от молекулярного типа. При низкой ионной силе буфера, в случае если поверхность отрицательно заряжена и белок имеет положительный заряд, у поверхности достигается высокая концентрация белков, что оказывает благоприятное воздействие на нуклеофилы белков при образовании сложных эфиров. Подходящий буферный раствор, в котором достигаются подобные условия, обычно получают из 10 mM ацетатного буфера с pH 4–6, в котором большая часть всех белков является положительно заряженной [13].

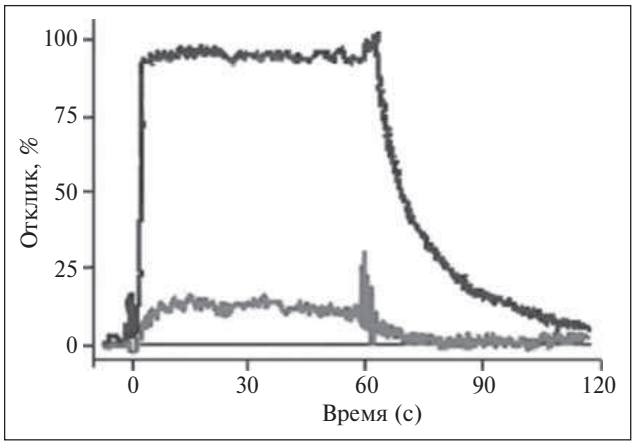

Рис. 3. *Сравнение степеней активности и связывания поверхностей незащищенного и защищенного (стабилизированного) p38α. Ингибитор (1 мкг) в более чем 2 ячейки, содержащие p38α. Одна поверхность содержала p38α, имобилизованный посредством стандартного связывания с помощью аминогрупп (красная), другая содержала p38α, стабилизированный с помощью ингибитора (синяя) [27]*

Поскольку аминогруппы довольно быстро теряют реакционную способность при нахождении в водном буферном растворе [32], биофункционализированная таким образом поверхность не может сохранять свою активность в течение длительного времени.

Аминное связывание может происходить в случае близкого расположения к активной группе или если молекуле не хватает аминогрупп (что может быть невозможным в случае, если присутствуют какие-то химические ограничения). Эффективной альтернативой связыванию посредством аминов является связывание посредством тиолов, которое основывается на реакциях с участием тиол-избирательных соединений [14]. В качестве тиол-реактивных групп в основном используются активные дисульфиды, такие, как пиридил дисульфид или его производные, хотя малеимид и производные ацилгалогенидов также являются подходящей альтернативой. Тиоловые группы могут быть также закреплены на поверхности сенсора и вступать в реакции с молекулами посредством тиол-реактивных групп или, наоборот, вступать в реакцию с поверхностью тиоловой группы и иммобилизоваться молекулой (рис. 4).

Различные соединения для модификации, основанные на эфирах активных дисульфидов, малеимидов или ацилгалогенидов, коммерчески доступные. Преимуществом модификации белка является минимизация числа активных состояний, что позволяет избегать перекрестных сшивок. Таким образом, даже если реагенты находятся вместе с аминогруппами, реакция может быть управляемой и сохранять химическую активность.

Дисульфиды могут образовывать связи в очень мягких условиях, в случае пиридилдисульфидов даже в кислотообразующем буферном растворе [33]. Бисульфитный мостик подвергается реакции замещения с соединениями свободных тиолов, которые могут ограничивать стабильность при определенных условиях. Например, буферные растворы с добавлением тиолов (таких, как меркаптоэтанол) могут приводить к расщеплению бисульфитного мостика и диссоциации иммобилизованно связанных партнеров. Подобный эффект может приводить к повторной модификации поверхности. После расщепления реактивного тиола при мягких алкалиновых условиях остаточные тиоловые группы на поверхности сенсора могут быть использованы для иммобилизации дисульфидсодержащих молекул [30].

Хотя иммобилизация белков посредством аминогруппы обычно не уменьшает число энергетических степеней свободы макромолекул или существенно не изменяет их параметры взаимодействия [25], тем не менее желательно наличие белка для его связи с партнером в прямой и однородной ориентации. Это может быть реализовано посредством химической модификации определенной области белка в растворе для контроля степени протекающих изменений или управления процессом иммобилизации.

Образование связей при определенном pH может также повлиять на активность. Например, если известно пространственное распределение заряженных аминокислот, становится возможным предсказать ориентацию, в которой белок будет иммобилизован на поверхность сенсора при данном pH (рис. 5). С другой стороны, можно препятствовать иммобилизации белка на поверхность посредством исключения состояний, необходимых для взаимодействия, при изучении в присутствии аналита в ходе процесса иммобилизации [7].

КАПСУЛИРОВАНИЕ ИЛИ ИЗОЛЯЦИЯ С ПОМОЩЬЮ МЕМБРАН

Один из распространенных методов, используемых при создании электрохимических сенсоров, состоит в том, что ферменты размещаются вблизи электрода, отделенные от остального раствора полупроницаемой мембраной, через которую могут проходить молекулы аналита и продукты каталити-

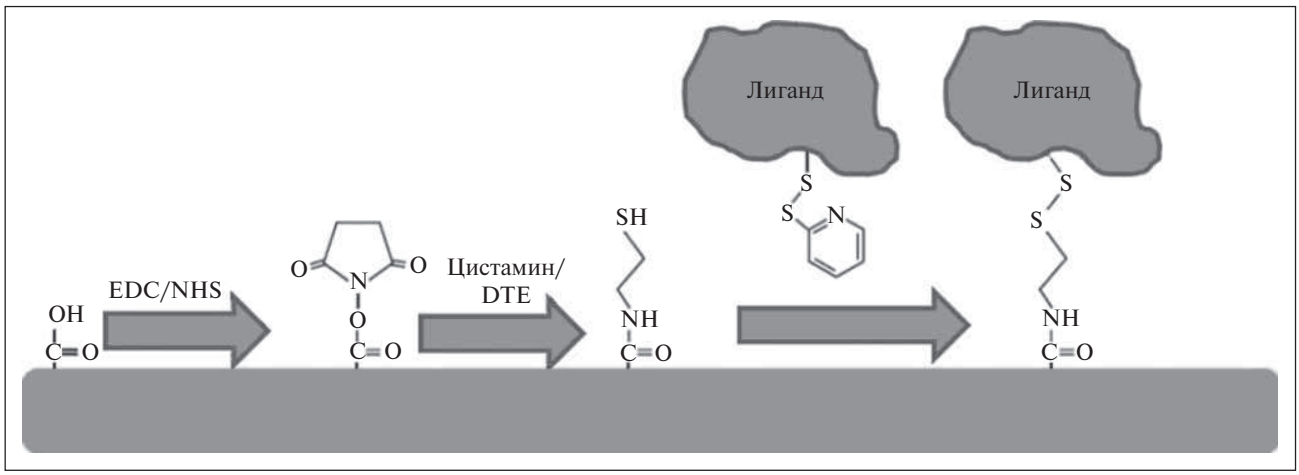

Рис. 4. *Иммобилизация биологических молекул на поверхности сенсора посредством ее модификации тиолами*

ческой реакции. Фактически ферменты находятся в свободном состоянии, однако они локализованы в одной части измерительной ячейки. Этот метод иногда называют микрокапсулированием. Один из наиболее известных примеров – полимер Nafion; из него изготавливаются отрицательно заряженные мембраны, которые часто используются в сенсорах на глюкозу [4].

Мембранные белки, участвующие в переносе молекул через мембрану клетки, довольно трудно использовать *in vitro*, так как они являются активными только когда их гидрофобные межмембранные области встроены в естественную структуру. Для сохранения данной структуры требуется окружение, очень близкое к этой гидрофобной среде, что превращается в большую практическую проблему в случае использования обычного водного окружения в большинстве *in vitro*-систем.

Однако изучение гидрофобных белков возможно посредством использования протоколов, специально разработанных для этих целей. Например, белки могут быть предварительно внедрены в липосомы и затем иммобилизованы на гидрофобную поверхность сенсора. Было обнаружено, что липидные бислои образуют связи с поверхностью сенсора через гидрофильные спейсеры, иммобилизованные на золотую поверхность сенсора, на которой находятся мембранные белки, участвующие в процессах переноса через мембрану клетки [29]. Основной акцент данной методики делается на помещение чувствительных областей белков в липидную среду, в которой они сохраняют свою естественную функциональную структуру.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сегодня биосенсоры в связи с их высокой чувствительностью и компактными размерами получили широкое распространение в различных сферах жизни человека. Например, они используются в клинической диагностике для проведения биохимических анализов, в фармакологии, для экологического мониторинга окружающей среды, в системах безопасности и во многих других областях.

В основном действие биосенсоров направлено на детектирование различных органических молекул, которые играют важную роль в живых организмах: высокомолекулярных (такие, как белки, ДНК) и низкомолекулярных (например, глюкозы и мочевины).

Важнейшей характеристикой сенсора является селективность, она отражает способность детектировать определенный аналит и не реагировать на посторонние вещества. Селективность определяется свойствами распознающего элемента, он находится в непосредственном контакте с исследуемым образцом и отвечает за химические и биохимические реакции, протекающие в процессе анализа. В данном обзоре были рассмотрены основные методы функционализации поверхности биологических сенсоров.

Наиболее часто распознающими элементами биосенсоров являются ферменты – высокоспецифичные катализаторы биохимических реакций. В состав фермента входят 1 или несколько белковых молекул, иногда присутствует небелковая часть. Каталитическая активность ферментов значительно выше, чем у любых искусственных катализаторов, ферменты увеличивают скорость реакции в 10^3–10^7 раз.

Наиболее универсальным направлением развития являются биосенсоры, использующие антитела, так как могут быть изготовлены для связывания чрезвычайно широкого класса веществ.

Антитела – это сложные белковые молекулы, построенные из нескольких субъединиц. Взаимодействие антиген – антитело считается наиболее селективным для применения в биосенсорах. С точки зрения физики, это взаимодействие осуществляется теми же по природе силами, что и взаимодействие фермента с субстратом: вандерваальсовыми силами, ионными, гидрофобными и гидрофильными взаимодействиями, водородными связями. Сложность применения антител в биосенсорах состоит в том, что акт связывания антигена часто сложно зарегис-

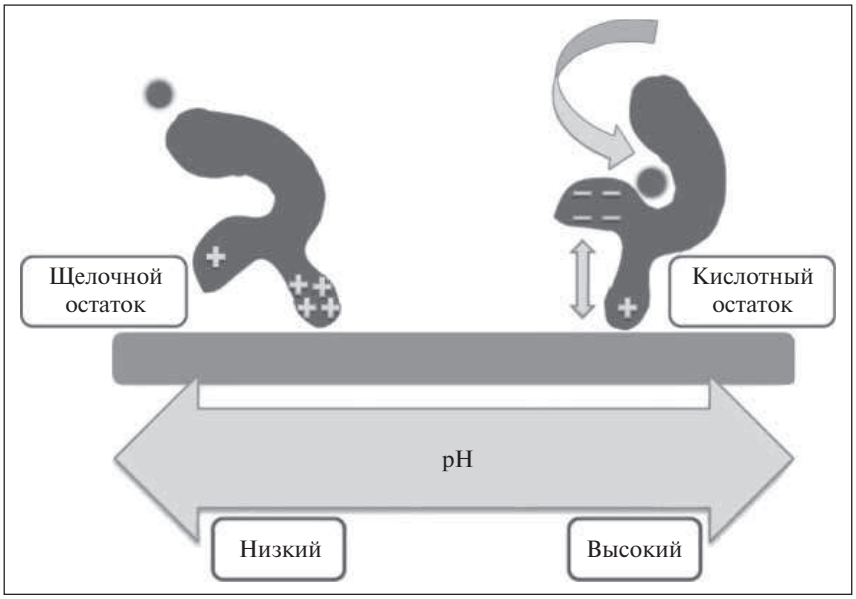

Рис. 5. *Заряд белка становится отрицательным или положительным в зависимости от pH буфера, в котором он растворен. Распределение заряда на поверхности белка зависит от ориентации, в которой он будет находиться при приближении к заряженной поверхности*

стрировать. Это является общим недостатком аффинных биосенсоров и требует применения специальных методов.

Адсорбция – наиболее старый из существующих способов иммобилизации ферментов. Удерживание адсорбированной молекулы фермента на поверхности носителя может обеспечиваться за счет неспецифических вандерваальсовых взаимодействий, водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий между поверхностью биосенсора и поверхностными группами белка. Вклад каждого из типов связывания зависит от химической природы поверхности биосенсора и функциональных групп на поверхности молекулы фермента. Преимуществом данного метода являются доступность и дешевизна сорбентов, выступающих в роли носителей. Им также можно придать любую конфигурацию адсорбционной матрицы. К сожалению, прочность связывания фермента с носителем не всегда достаточно высока, что ограничивает применение метода. К недостаткам адсорбционной иммобилизации следует отнести отсутствие общих рекомендаций, позволяющих правильно выбрать оптимальные условия иммобилизации конкретного фермента.

Некоторых из перечисленных затруднений можно избежать при иммобилизации ферментов путем включения в гели. Молекулы фермента включаются в 3-мерную сетку из тесно переплетенных полимерных цепей, образующих гель. Среднее расстояние между соседними цепями в геле меньше размера молекулы включенного фермента, поэтому он не может покинуть полимерную матрицу и выйти в окружающий раствор, т.е. находится в иммобилизованном состоянии. Дополнительный вклад в удерживание фермента в сетке геля могут вносить также ионные и водородные связи между молекулой фермента и окружающими ее полимерными цепями. Пространство между полимерными цепями в геле заполнено аналитом, на долю которого обычно приходится значительная часть объема геля.

Для иммобилизации ферментов в геле существует 2 основных способа. При одном из них фермент помещают в раствор мономера, а затем проводят полимеризацию, в результате чего образуется полимерный гель с включенными в него молекулами фермента. В реакционную смесь часто добавляют бифункциональные (содержащие в молекуле 2 двойные связи) сшивающие агенты, которые придают образующемуся полимеру структуру 3-мерной сетки. В другом случае фермент вносят в раствор готового полимера, который затем каким-либо образом переводят в гелеобразное состояние. Способ иммобилизации ферментов путем включения в полимерный гель позволяет создавать препараты любой геометрической конфигурации, обеспечивая при этом равномерное распределение биокатализатора в объеме носителя.

Метод универсален, применим для иммобилизации практически любых ферментов, полиферментных систем, клеточных фрагментов и клеток. Фермент, включенный в гель, стабилен, надежно защищен от инактивации вследствие бактериального заражения, так как крупные клетки бактерий не могут проникнуть в мелкопористую полимерную матрицу. В то же время эта матрица может создавать значительные препятствия для диффузии субстрата к ферменту, снижая каталитическую эффективность иммобилизованного препарата, поэтому для высокомолекулярных субстратов данный метод иммобилизации неприменим вообще.

Общий принцип иммобилизации ферментов с использованием мембран заключается в том, что раствор фермента отделяется от раствора субстрата полупроницаемой перегородкой. Полупроницаемая мембрана легко пропускает небольшие молекулы субстрата, но непреодолима для крупных молекул фермента. Существующие модификации этого метода различаются лишь способами получения полупроницаемой мембраны и ее природой. Раствор фермента можно включать внутрь микрокапсул, представляющих собой замкнутые сферические пузырьки с тонкой полимерной стенкой (микрокапсулирование). При двойном эмульгировании получается эмульсия из капель органического раствора полимера, содержащих еще более мелкие капли раствора фермента. Через некоторое время растворитель затвердевает, образуя сферические полимерные частицы с иммобилизованным в них ферментом. К модификациям метода иммобилизации ферментов с использованием полупроницаемых оболочек относятся также включение в волокна (при этом вместо капель, содержащих ферменты, получаются нити) и включение в липосомы. Применение систем мембранного типа позволяет получать иммобилизованные препараты с высоким содержанием фермента. Метод, как и предыдущий, достаточно универсален, т.е. применим как к ферментам, так и к клеткам, а также их фрагментам. Благодаря высокому отношению поверхности к объему и малой толщине мембраны удается избежать значительных диффузионных ограничений скорости ферментативных реакций. Основной недостаток мембранных систем – невозможность ферментативного превращения высокомолекулярных субстратов.

Рассмотренные выше методы относятся к физическим методам иммобилизации ферментов. Главным отличительным признаком химических методов иммобилизации является то, что путем химического взаимодействия на структуру фермента в его молекуле создаются новые ковалентные связи, в частности, между белком и поверхностью сенсора. Такие системы обладают по крайней мере 2 важными достоинствами. Во-первых, ковалентная связь фермента с поверхностью биосенсора обеспечива-

ет высокую прочность образующейся системы. При широком варьировании таких условий, как pH и температура, фермент не десорбируется с поверхности и не загрязняет продукты катализируемой им реакции. Это особенно важно для обеспечения устойчивых, воспроизводимых результатов в аналитических системах. Во-вторых, химическая модификация ферментов способна приводить к существенным изменениям их свойств, таких, как селективность, активность и стабильность.

Из всех методов иммобилизации наиболее гибким и распространенным является метод ковалентного связывания. В каждом конкретном случае он требует тщательного выбора химических реагентов для модификации поверхности; для многих систем он обеспечивает размещение монослоя биоматериала на подложке. Однако в случае серийного изготовления биосенсоров метод ковалентного связывания кажется малопривлекательным из-за сложности и дороговизны, поэтому в промышленных процессах чаще используются те или иные методы физической иммобилизации.

* * *

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках госконтракта № 11.519.11.3014.

ЛИТЕРАТУРА

1. Володькин Д.В. Иммобилизация белков в микрочастицы, сформированные методом последовательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов. – М., 2005. – 166 с.
2. Карякин А.А., Уласова Е.А., Вагин М.Ю., Карякина Е.Е. Биосенсоры: Устройство. Классификация и функциональные характеристики // Сенсор. – 2002; 1: 16–24.
3. Коптилова О.В., Филатова Н.М., Асулян Л.Д. Полимерная композиция на основе поливинилового спирта для иммобилизации микроорганизмов // ADV. CUR. NAT. SCI. – 2011; 8: 44–5.
4. Эггинс Б. Химические и биологические сенсоры. – М.: Техносфера, 2005.
5. Bergström J., Johnsson B., Löfås S. Sensing surfaces capable of selective biomolecular interactions, to be used in biosensor systems // 1990, Patent appl. WO90/05303.
6. Bishop A., Nuzzo R. Self-assembled monolayers: Recent developments and applications // J. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. – 1996; 1: 127–36.
7. Casper D., Bukhtiyarova M., Springman E. A Biacore biosensor method for detailed kinetic binding analysis of small molecule inhibitors of p38alpha mitogen-activated protein kinase // J. Anal. Biochem. – 2004; 325: 126–36.
8. Chiang C., Hsiau L., Lee W. Immobilization of cell-associated enzymes by entrapment in polymethacrylamide beads // Biotechnol. Tech. – 2004; 11 (2): 121–5.
9. Day S., Baird L., Rich R. et al. Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods // J. Protein Sci. – 2002; 11: 1017–25.
10. Disley D., Blyth J., Cullen D. et al. Covalent coupling of immunoglobulin G to a poly(vinyl)alcohol-poly(acrylic acid) graft polymer as a method for fabricating the interfacial-recognition layer of a surface plasmon resonance immunosensor // J. Biosens. Bioelectron. – 1998; 13: 383–96.
11. Frey B., Corn R. Covalent attachment and derivatization of poly(L-lysine) monolayers on gold surfaces as characterized by polarization-modulation FT-IR spectroscopy // J. Anal. Chem. – 1996; 68: 3187–93.
12. Guo Z., Xu S., Lei Z. et al. Immobilized metal-ion chelating capillary microreactor for peptide mapping analysis of proteins by matrix assisted laser desorption/ ionization-time of flight-mass spectrometry // Electrophoresis. – 2003; 24 (21): 3633–9.
13. Johnsson B., Löfås S., Lindquist G. Immobilization of proteins to a carboxymethyldextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors // J. Anal. Biochem. – 1991; 198: 268–77.
14. Johnsson B., Löfås S., Lindquist G. et al. Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies // J. Mol. Recognit. – 1995; 8: 125–31.
15. Liedberg B., Nylander C., Lundström I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing // J. Sensor Actuator. – 1983; 4: 299–304.
16. Lin J., Chang I., Andrade J. et al. Comparison of site-specific coupling chemistry for antibody immobilization on different solid supports // J. Chromatogr. – 1991; 542: 41–54.
17. Löfås S. Dextran modified self-assembled monolayer surfaces for use in biointeraction analysis with surface plasmon resonance // J. Pure Appl. Chem. – 1995; 67: 829–34.
18. Löfås S., Johnsson B. A novel hydrogel matrix on gold surfaces in surface plasmon resonance sensors for fast and efficient covalent immobilization of ligands // J. Chem. Soc. Chem. Commun. – 1990; 21: 1526–8.
19. Löfås S., Malmqvist M., Rönnberg I. et al. Bioanalysis with surface plasmon resonance // J. Sensor Actuator B. – 1991; 5: 79–84.
20. Lojou É., Bianko P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices // J. Electroceram. – 2006; 16: 79–91.
21. Lundström I. Real-time biospecific interaction analysis // J. Biosens. Bioelectron. – 1994; 9: 725–36.
22. Marco M., Barcel D. Environmental applications of analytical biosensors // Meas. Sci. Technol. – 1996; 7: 1547–62.
23. Migneault I., Dartiguenave C., Vinh J. et al. Comparison of two glutaraldehyde immobilization techniques for solid-phase tryptic peptide mapping of human hemoglobin by capillary zone electrophoresis and mass spectrometry // Electrophoresis. – 2004; 25 (9): 1367–78.
24. Myszka D. Survey of the 1998 optical biosensor literature // J. Mol. Recognit. – 1999; 12: 390–408.
25. Myszka D., Abdiche Y., Arisaka F. et al. The ABRF-MIRG´02 study: assembly state, thermodynamic, and kinetic analysis of an enzyme/inhibitor interaction // J. Biomol. Tech. – 2003; 14: 247–69.
26. Nanduri V., Sorokulova I., Samoylov A. et al. Phage as a molecular recognition element in biosensors immobilized by physical adsorption // Biosensors and Bioelectronics. – 2007; 22: 986–92.
27. Nuzzo R.G., Allara J. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces // J. Am. Chem. Soc. – 1983; 105: 4481–3.
28. Ostuni E., Chapman R., Holmlin R. et al. A survey of structure property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein // J. Langmuir. – 2001; 17: 5605–20.
29. Sevin-Landais A., Rigler P., Tzartos S. et al. Functional immobilisation of the nicotinic acetylcholine receptor in tethered lipid membranes // J. Biophys. Chem. – 2000; 85: 141–52.
30. Shannessy D., Brigham-Burke M., Peck K. Immobilization chemistries suitable for use in the BIAcore surface plasmon resonance detector // J. Anal. Biochem. – 1992; 205: 132–6.
31. Sigal G., Mrksich M., Whitesides G. Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents // J. Am. Chem. Soc. – 1998; 120: 3464–73.
32. Sprik M., Delamarche E., Michel B. et al. Structure of hydrophilic self-assembled monolayers: A combined scanning tunneling microscopy and computer simulation study // J. Langmuir. – 1994; 10: 4116–30.
33. Stuchbury T., Shipton M., Norris R. et al. A reporter group delivery system with both absolute and selective specificity for thiol groups and an improved fluorescent probe containing the 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole moiety // J. Biochem. – 1975; 151: 417–32.
34. Turner A., Karube I., Wilson G. Biosensors, fundamentals and applications // Oxford: Oxford University Press. – 1987; 240.
35. Ulman A. Thin films: self-assembled monolayers of thiols // Academic, San Diego. – 1998.
36. William H. Scouten, John H. Loung, R. Stephen Brown // Trends in biotechnology. – 1995; 13: 178–85.