

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. В.М.ЛОМОНОСОВА

Химический Факультет

Курсовая работа

по физической химии

Разработка методов регистрации нерастворимых продуктов
пероксидазной реакции в нанометровом диапазоне.

Студента 407 группы

XXXXXXXXXX X.X.

Научный руководитель

XXXXXXXXXX X.X.

Преподаватель

XXXXXXXX X.X.

Москва 200X

Оглавление

| | |
|---|----|
| Введение | 3 |
| Литературный обзор | 4 |
| Метод атомно-силовой микроскопии | 4 |
| Основные принципы атомно-силовой микроскопии..... | 4 |
| Силы, действующие между кантилевером и образцом..... | 5 |
| Режимы работ AFM..... | 6 |
| Исследование биологических макромолекул методом AFM | 8 |
| Пероксидаза из <i>Artemisia rusticana</i> (HRP)..... | 12 |
| Общая характеристика [29] | 12 |
| Преципитирующие субстраты..... | 14 |
| Экспериментальная часть..... | 15 |
| Оборудование и материалы | 15 |
| Методика приготовления образцов для AFM | 15 |
| Обсуждение результатов..... | 17 |
| Выводы..... | 21 |
| Список литературы..... | 22 |

Введение

Пероксидаза широко используется в качестве метки для иммуноферментного анализа. В качестве субстратов обычно используют ТМВ (для фотометрического проявления), 10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин (для флюоресцентного детектирования). Эти методы позволяют регистрировать перекись водорода в концентрации о 10 пМ, что в свою очередь обеспечивает чувствительность иммуноферментного анализа на уровне 0,1-0,01 нг в мл. Для анализа ряда антигенов, таких как прионовые белки и возбудители особо опасных инфекционных заболеваний необходимо надежно регистрировать десятки молекул или отдельные возбудители. Достижение таких уровней чувствительности возможно с использованием методов сканирующей зондовой микроскопии. В частности, перспективным методом детекции единичных межмолекулярных взаимодействий является регистрация нерастворимых полимерных продуктов пероксидазной реакции в комплексах антиген-антитело на поверхности сенсорного элемента.

Настоящая работа была направлена на разработку метода регистрации нерастворимых продуктов реакций окисления 4-хлорнафтола и 3,3'-диаминобензидина перекисью водорода под действием адсорбированной на подложку пероксидазы.

Литературный обзор

Метод атомно-силовой микроскопии

Основные принципы атомно-силовой микроскопии

Основой атомно-силовой микроскопии (AFM, atomic force microscopy) является наличие микроскопического зонда, который приводится в *контакт* (не всегда речь идет о механическом контакте) с исследуемой поверхностью и, в процессе *сканирования*, перемещается по некоторому участку поверхности заданного размера.

Схема рабочей части атомно-силового микроскопа показана на рис. 1.

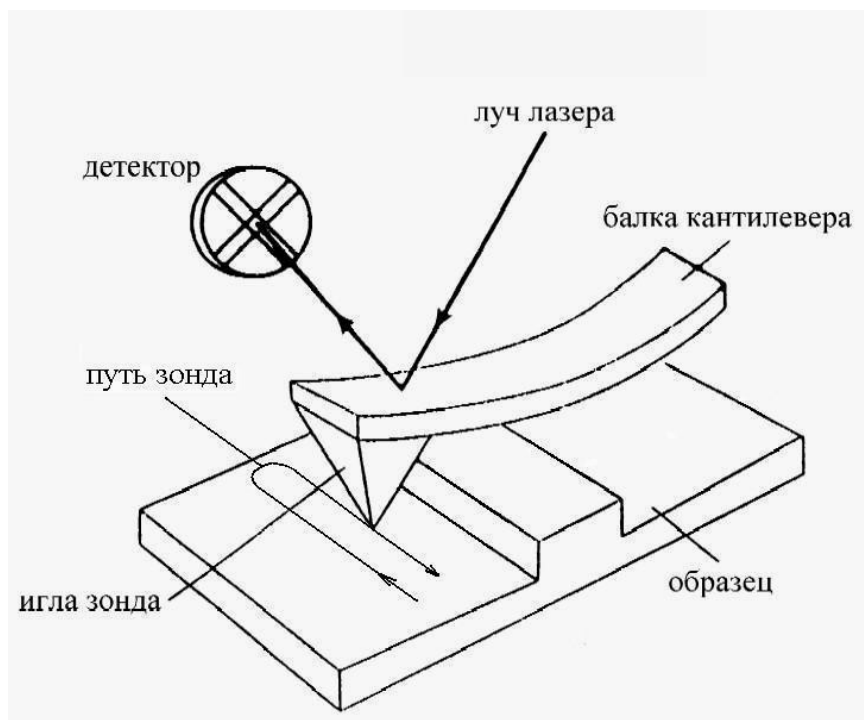


Рис.1.Схема рабочей части AFM.

В AFM используется зонд в виде очень острой иглы (обычно из нитрида кремния), который закреплен на жестко-упругом кантилевере, способном реагировать (изменять свой изгиб) на силы порядка долей наноньютона [1].

Контакт зонда и образца подразумевает их взаимодействие. При малом расстоянии между зондом и поверхностью (порядка ангстремов) между ними возникают силы притяжения или отталкивания различной природы.

Изменение изгиба балки кантилевера фиксируется с помощью луча лазера, который отражается от окончания балки и попадает на четырехсекционный фотодетектор. В релаксированном состоянии балки сигналы всех четырех секторов равны. При сканировании разность сигналов в секторах детектора (сигнал рассогласования) несет информацию об изгибе кантилевера (рис. 2).

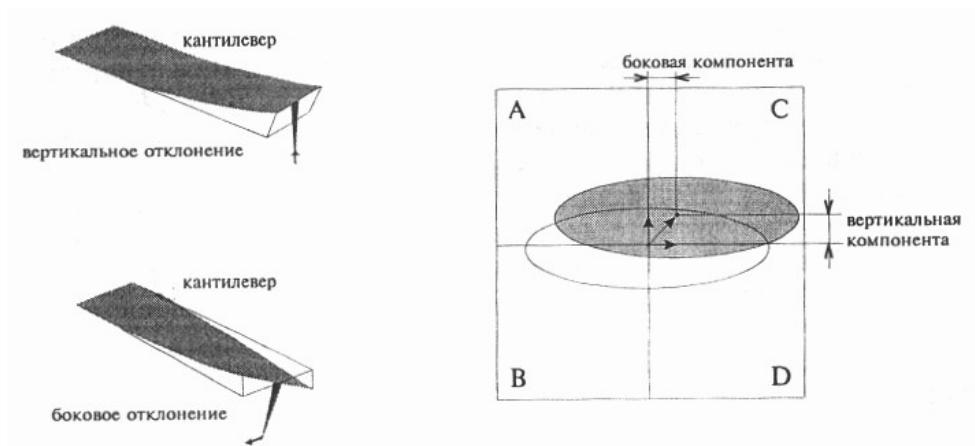


Рис.2. Возникновение вертикального отклонения и кручения кантилевера.

Силы, действующие между кантилевером и образцом

При приближении кантилевера к поверхности образца на него начинает действовать сила Ван-дер-Ваальсова притяжения. Она заметна с расстояния десятков ангстрем. Затем на расстоянии в несколько ангстрем начинает действовать сила отталкивания (рис. 3).

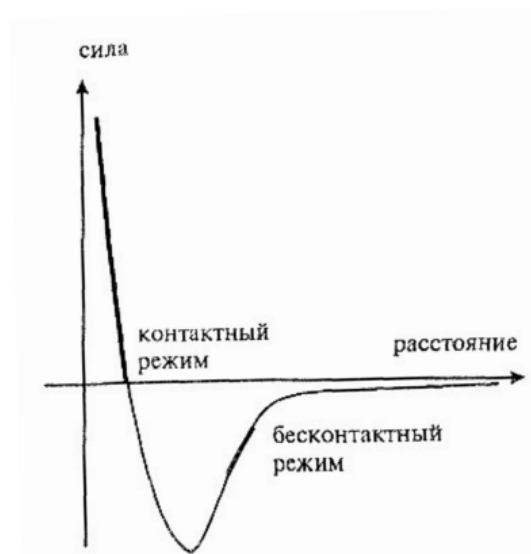


Рис. 3. Ван-дер-Ваальсовы силы между образцом и зондом.

Во влажном воздухе на поверхности образца присутствует слой воды. Возникают капиллярные силы, дополнительно прижимающие кантилевер к образцу и увеличивающие минимально достижимую силу взаимодействия.

Достаточно часто может возникать электростатическое взаимодействие между зондом и образцом. Это может быть отталкивание, так и притяжение. Влияние электростатических сил, как правило, стремятся свести к минимуму. В случае проводящих образцов этого достигают, заземляя образец.

Величина результирующей всех этих сил оценивается в 10^{-8} - 10^{-9} Н.

Режимы работ АФМ.

Деление АФМ по способу измерения и фиксации силового взаимодействия зонда и образца позволяет выделить три случая: контактная атомно-силовая микроскопия, бесконтактный режим и режим прерывистого контакта [1, 2].

Контактный режим

Кантилевер непосредственно касается иглой поверхности образца и работает на отталкивание от поверхности. В идеальных условиях сила воздействия на образец определяется прогибом и жесткостью балки.

Топография поверхности (режим постоянной силы). Зонд осуществляет сканирование образца в горизонтальной плоскости, при этом изгиб кантилевера поддерживается постоянным за счет использования обратной связи. Вертикальные перемещения кантилевера в таком режиме фактически описывают топографию исследуемой поверхности. Сильная зависимость дисперсионных сил от расстояния между зондом и поверхностью позволяет получить уникальное разрешение по вертикали порядка долей ангстрема, а пьезокерамический сканер обеспечивает разрешение по горизонтали на уровне одного ангстрема.

Режим постоянной высоты. В этом режиме фиксируется положение кантилевера по высоте, а регистрируемым сигналом становится сигнал рассогласования фотодетектора. Используя результаты снятия зависимости прогиба кантилевера от расстояния между зондом и образцом, можно пересчитать регистрируемый ток фотодетектора в линейные размеры.

Режим регистрации ошибки обратной связи. Ошибка обратной связи, возникающая при сканировании в режиме постоянной силы, содержит дополнительную информацию о топографии. Данный режим находит применение при обнаружении мелких деталей поверхности, однако не дает количественной информации о высоте [3]. Также этот режим можно использовать как промежуточный между режимом постоянной силы и постоянной высоты, если отрегулировать скорость отработки обратной связи так, чтобы она отслеживала пологие изменения рельефа и не успевала отслеживать крутые. Тогда во время пересечения зондом небольших неровностей сканирование будет происходить при почти одинаковой высоте. В результате на изображении ошибки обратной связи будут слабо проявляться медленные изменения рельефа и с высоким контрастом – резкие. Это может быть полезным для отыскания мелких неровностей на большом поле на фоне крупных пологих особенностей рельефа.

Режим измерения боковых сил. Во время перпендикулярного сканирования возникает дополнительная крутильная деформация кантилевера. Она обусловлена

моментом сил, действующих на острие иглы. Угол кручения при небольших отклонениях пропорционален боковой силе. Луч лазера, отраженный от кантилевера, получает в этом случае дополнительное смещение в боковом направлении (рис. 2).

При движении по плоской поверхности, на которой присутствуют участки с разным коэффициентом трения, угол кручения будет изменяться от участка к участку (рис. 4а).

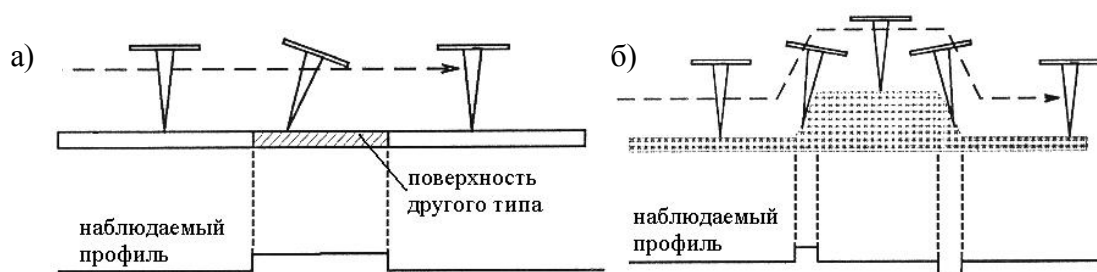


Рис. 4. а) Возникновение кручения кантилевера при движении по неоднородной поверхности; б) Возникновение кручения кантилевера при движении по неровной поверхности.

Это позволяет говорить об изменении локальной силы трения. Если присутствует рельеф, то такая интерпретация невозможна (рис. 4б). Тем не менее, этот режим измерений позволяет получать изображения, на которых хорошо видны мелкие особенности рельефа, и облегчать их поиск.

Бесконтактный режим

В этом режиме кантилевер заставляют колебаться на его резонансной частоте. Вблизи поверхности образца вибрирующий с малой амплитудой кантилевер попадает в неоднородное силовое поле. Наличие градиента силы приводит к частотному сдвигу резонансного пика.

Режим топографии. Обратная связь в процессе сканирования меняет положение зонда по нормали к поверхности, поддерживая постоянной либо амплитуду, либо фазу колебаний кантилевера. Результатом в этом случае является поверхность постоянного градиента силы.

Режим постоянной высоты. Регистрируется изменение амплитуды либо фазы колебаний в процессе сканирования, не меняя расстояние между зондом и образцом.

Использование вибрации на достаточно высокой частоте позволяет, с одной стороны, регистрировать дифференциальные характеристики, поддерживая постоянные средние значения величин, а с другой стороны – значительно уменьшать величины шумов за счет переноса спектра сигнала из области вблизи 0 Гц в область высоких частот.

Полуконтактный режим

Характерной чертой полуконтактного режима является то, что большую часть периода колебаний кантилевер не касается поверхности и вообще относительно слабо взаимодействует с образцом. И только при сближении иглы с поверхностью вплоть до попадания в область отталкивающего потенциала взаимодействие резко усиливается, и при этом соударении кантилевер теряет избыток энергии, накопленный за остальную часть периода. В зависимости от характера взаимодействия может меняться сдвиг фазы основной гармоники колебания относительно возбуждающего сигнала и амплитуда и фаза высших гармоник. Базовым эффектом является ограничение амплитуды колебаний на уровне, примерно равном расстоянию между вершиной иглы в свободном состоянии кантилевера и поверхностью.

Оба режима (бесконтактный и полуконтактный) основаны на колебании кантилевера, в зарубежной литературе получили название «тейпинговых» режимов.

Исследование биологических макромолекул методом AFM

Техника подготовки образцов для AFM

Одной из главных целей применения AFM в биохимии является изучение топографии биологических молекул. При этом важную роль играет подбор подложки и ее подготовка таким образом, чтобы объекты исследования сохраняли свою конформацию и активность (для ферментов) по сравнению с таковой в растворе. С другой стороны, силы адгезии должны быть достаточно велики, чтобы при сканировании молекулы не «счищались» иглой кантилевера. Стоит отметить, что общей методики, пригодной во всех случаях, не существует, и используемые методики определяются спецификой задачи, т.е. являются методиками «на конкретный случай».

Поверхности. Наилучшими поверхностями для анализа методом AFM являются поверхности, размеры неровностей которых значительно меньше ожидаемых размеров молекул, нанесенных на эту поверхность для исследования. Наиболее часто используют слюду, высокоориентированный пиролитический графит (HOPG), стекло. Пригодны также: напыленная платина, ровные монокристаллы золота, эпитаксиальная пленка золота на слюде, окисная пленка TiO_2 или $Rb_{0,3}MoO_3$, арсенид галлия, слоистые полупроводниковые кристаллы типа MoS_2 , оксид кремния, титанат стронция.

Иммобилизация объектов. Методы иммобилизации биомолекул могут быть как химическими, так и физическими, а также представлять собой их комбинацию. К физическим методам относятся прежде всего адсорбция на водонерастворимые носители и включение в водонерастворимые полимерные гели. Иммобилизация химическим путем происходит ковалентным связыванием водонерастворимыми носителями. Каждый из

этих методов имеет множество вариантов [4], обычно эмпирически находимых в зависимости от поставленной задачи.

Активация и химическая модификация атомарно плоской поверхности слюды для использования в АФМ исследованиях являются самыми популярными среди исследователей. Обработка поли-L-лизинном для улучшения адгезии использовалась в [5]. Okusa с сотр. [6] изучили большое количество хлорсиланов или алкосиланов с такими функциональными группами, как трифторметил-, меркапто-, amino-, диметиламино-, изоцианат-, карбамат-, 4,5-дигидроимидазол- и хлорбензильные, ковалентно пришитых к поверхности слюды, которые образуют плотное монослойное покрытие для иммобилизации белков.

Одним из самых популярных методов является ковалентная пришивка белков глутаровым альдегидом к силанизированным поверхностям. В работе [7] Allen и сотр. Использовали кремниевые пластинки с ковалентно пришитыми антителами. Поверхность силанизировалась 1,5% (об.) раствором (3-аминопропил)диметилэтоксисилана в толуоле. Затем ее активировали инкубацией с 10% (об.) раствором глутарового альдегида и добавляли антитела.

Универсальным и весьма технологичным выглядит подход, основанный на использовании высокоафинной пары биотин-стрептавидин. Конъюгаты целевых молекул с биотином могут быть прочно связаны со стрептавидиновыми молекулами, иммобилизованными на подложке [8]. Данные работы [9] показывают, что такой подход позволяет существенно увеличить поверхностную плотность и сохранить функциональность антител. Этот факт хорошо иллюстрируют следующие цифры: при пассивной адсорбции только 5% поверхности занимается целевым белком (в данном случае ферритином), при использовании аффинной пары стрептавидин-биотин удается заполнить 70% поверхности.

Стеклянные покровные стекла очень популярны для работ в жидкостных ячейках. Фотоактивируемый сшивающий агент N-5-азидо-2-(нитробензоилокси)сукцинимид, как было показано [10, 11], служит фиксатором объекта к стеклу. Другими фотохимическими фиксирующими агентами являются поли(3-азидостирен) и поли(N,N-диметилакриламид-со-азидостирен) для использования при иммобилизации белков к полимерным субстратам.

Другой стратегией для фиксирования белков к различным субстратам является обработка поверхностей тлеющим разрядом [12], что очищает поверхность от сорбировавшихся углеводородов и окислов и, следовательно, увеличивает ее гидрофильность и облегчает адсорбцию белков. В работе Droz и сотр. [13] изучали действие

тлеющего разряда на смачиваемость различных субстратов, применяемых в AFM. Показано увеличение гидрофильности после обработки слюды, кремния, WSe_2 и некоторых других поверхностей. В другой работе этих же авторов [14] обработку высокоориентированного пиролитического графита проводили при обоих полярностях напряжения разряда. Лучшие результаты по шероховатости поверхности графита (0,3 нм) и степени гидрофильности получены при отрицательном напряжении. Адсорбция молекул IgG на модифицированный графит показало намного более однородное распределение молекул белка по поверхности и более сильную адгезию белка к графиту по сравнению с необработанным графитом.

По методу Wagner с сотр. [15, 16] белки можно пришивать через аминокислотные остатки к дитио-бис(сукцимидилундеканату) (DSU). DSU — аминокислотный сшивающий агент, который образует на золотой поверхности самоукладывающийся слой.

В работе Rief и сотр. [17] декстраны со средней молекулярной массой 500.000 пришивались к поверхности золота с помощью эпоксиалкантиолов.

Ludwig с сотрудниками [18] получили образцы стрептавидина, образующего на поверхности упорядоченный рисунок. Подложкой служило покровное стекло, которое силанизировали эпоксицианом в пропанол. После промывки пропанолом и высушивания при комнатной температуре подложку инкубировали в растворе декстрана в течение 20 часов. Затем через электронномикроскопическую решетку (2000 ячеек, Plano, Marburg, Germany) напылили слой золота, толщиной 20 нм. Инкубация в бромуксусной кислоте в течение 16 часов превратила гидроксигруппы декстрана в гидроксикарбоксильные. Добавили N-гидроксисукцинимидные (NHS) группы путем инкубации образцов в растворе EDAC [1-этил-3(3-диметиламино пропил) карбодиимид гидрохлорид] и NHS в течение 30 мин. Лизиновые группы стрептавидина связывались с NHS-активированным декстраном в течение примерно 12 час. Промывка гидрохлоридом этаноламина для того, чтобы прореагировали активные эфиры и для того, чтобы удалить свободный стрептавидин. Поверхность золота заблокировали с помощью BSA, чтобы избежать неспецифической адгезии.

В работах [19, 20] для иммобилизации Fab-частей антител использовали их конъюгат, полученный ковалентной пришивкой к фосфолипиду димиристоил-L- α -фосфатидил-DL-глицерину (DMPG). Липид-белковая пленка формировалась на алкилированной октадецилтрихлорсиланом поверхности слюды (или кварца) с использованием Ленгмюровской технологии.

AFM Белковых макромолекул

Наибольшее количество исследований по данной теме относятся к антителам, как наиболее доступным из больших белковых молекул. Деление белковых молекул на крупные и небольшие произведено потому, что для первых разрешающая способность AFM потенциально позволяет определить топографию поверхности, а порой и даже отдельных субъединиц, что позволяет говорить об их уверенной идентификации данным методом. Для небольших молекул возможно лишь определить наличие или отсутствие белка на подложке, не получая никакой информации о топографии поверхности молекулы.

Антитела. В работе [21] IgG кролика наблюдались в тейпинговом режиме. Подготовка белка заключалась в нанесении обессоленного раствора белка на свежесколотую слюду и последующем высушивании. Достигнуто горизонтальное разрешение 3-5 нм, что по мнению авторов, является достаточным для распознавания отдельных молекул.

В работе [22] изучались антитела на человеческий сывороточный альбумин (а-HSA) также в тейпинговом режиме. Показано, что адсорбированные на слюду а-HAS могут существовать в четырех основных конформациях. Исследована зависимость топографии от способа съемки. Наименьшее воздействие на образец происходит в бесконтактном режиме, тогда как полуконтактный режим оказывает необратимое разрушающее воздействие на объекты.

Процессы адсорбции IgG на свежесколотой или силанизированной слюде и его десорбции под действием ПАВ рассмотрены в работе [23]. Показано, что белковые молекулы могут формировать на поверхности плоские агрегаты, устойчивые к действию такого сильного ПАВ, как додецилсульфат натрия.

Weiping с сотр. [24] изучали нативный IgG и IgG, у которого с помощью NaIO_4 были удалены олигосахаридные остатки (вместо длинной углеводной цепочки остается карбонильная группа). Исходные и модифицированные молекулы образуют на поверхности слюды, модифицированной APTEС, пленки с различным углом наклона белковых молекул. Авторы объясняют этот эффект химическим взаимодействием карбонильных групп IgG (модиф.) и аминогрупп поверхности, тогда как в случае нативного белка такое взаимодействие невозможно.

Небольшие белковые молекулы. Kossek с сотр. [25] изучали комплекс стрептавидин-биотин. Процесс иммобилизации проводился, как описано в [18]. Подложками служили слюда и золото на диоксиде кремния. При сканировании в контактном режиме наблюдалась денатурация белковых молекул, вызванная давлением

со стороны кантилевера. Образцы после тейпинг-режима сохраняли свою конформацию. Еще одним способом локализации комплекса стрептавидин-биотин, использованным в работе, является получение конъюгатов с коллоидными частицами золота и ферритином. Авторами также рассмотрены причины и характер уширения реального рельефа при использовании кантилеверов большого радиуса.

В работе [26] адсорбция бычьего фибриногена (BFG) на немодифицированных поверхностях HOPG и слюды с помощью AFM изучалась в режиме реального времени в жидкостной ячейке. В равных условиях на поверхности графита формируются агрегаты молекул размером 6-13 нм, тогда как на поверхности слюды наблюдалась сорбция отдельных молекул с образованием мономолекулярного слоя белка. Авторами предпринята попытка объяснить это явление, исходя из молекулярной структуры BFG.

Исследование адсорбции β -лактоглобулина, а также стандартного концентрата сыворотки крови (WPS 80) на поверхности слюды проводилось с использованием тейпинг-методики [27]. Показано, что β -лактоглобулин и WPS 80 образуют на поверхности мономолекулярную пленку, тогда как охлажденный раствор WPS 80 образует на поверхности слюды молекулярные агрегаты размером 20-30 нм.

Корреляцию между молекулярным весом белков и их объемом изучали в работе [28]. На примере 8 белков с молекулярной массой от 38 кДа до 900 кДа показана 99% корреляция молекулярной массы и объема белка, что, по мнению авторов, свидетельствует о постоянстве плотности для всех белковых молекул и довольно плотной упаковке частей белковых глобул.

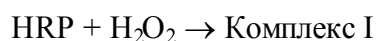
Пероксидаза из *Armoracia rusticana* (HRP).

Общая характеристика [29]

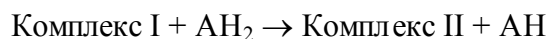
Номер по международной классификации 1.11.1.7., класс оксидоредуктаз.

Схема протекания реакции (рис. 5):

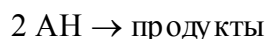
1) Образование активного комплекса I:



2) Две одноэлектронных окислительно-восстановительных реакции:



3) Образование продуктов реакции:



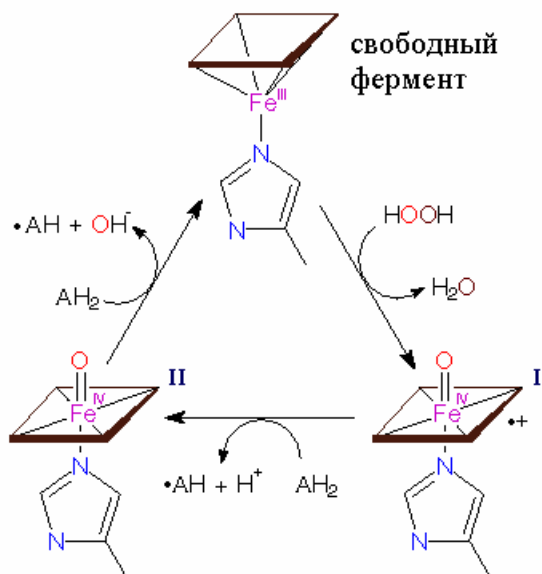


Рис. 5. Схема изменений в активном центре фермента в процессе катализа.

Специфичность к субстратам, относительные скорости и K_m . Пероксидаза очень специфична к субстратам-акцепторам водорода, которыми могут быть лишь пероксид водорода (относительная скорость 100), метилпероксид (относительная скорость 0,17) или этилпероксид (относительная скорость 0,4). С другой стороны, пероксидаза имеет довольно низкую специфичность относительно субстрата-донора водорода. Число таких субстратов велико, перечислим лишь наиболее часто используемые: 4-гидроксидифенил, 1,2-фенилендиамин (относительная скорость 100), 1,3-фенилендиамин (относительная скорость 2), гидрохинон (6), пирогаллол (0,6), гваякол (0,5), тетраметилбензидин, аскорбат (0,04), NADH (0,006).

Поскольку пероксидаза – двухсубстратный фермент, то K_m (эфф) может зависеть как от концентрации донора водорода, так и от концентрации пероксида водорода в зависимости от условий эксперимента. Насыщение по донору, как правило, достижимо и индивидуально для каждого субстрата, тогда как насыщение по перекиси недостижимо, так как фермент ингибируется последней в высоких концентрациях [30].

Структурные параметры. Пероксидаза представляет собой мономерный гликопротеин с молекулярной массой 44.000, содержащий 306 аминокислотных остатка, протогем в качестве простетической группы, а также два иона кальция в структуре. Линейный размер белковой глобулы в растворе составляет 4 нм. Структура белковой части пероксидазы представлена на рис.6.



Рис.6. Структура белковой части пероксидазы (серые шарики – ионы кальция, в центре молекула протогема)

Оптимум рН 6,0-6,5 (активность при 7,5 составляет приблизительно 84% от максимальной). Peroксидаза активируется аммиаком, пиридином и имидазолом (все при рН > 7), ПАВами. Ингибиторами являются азид-ионы, цианид-ионы (10 мкМ), сульфид-ионы (1 мкМ), фторид-ионы, гидроксилламин (1 мМ). Также пероксидаза инактивируется при щелочном рН. Изоэлектрическая точка 8,0-8,9.

Полосы поглощения: 403 нм $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (полоса Сорета), 497 нм, 641 нм.

Преципитирующие субстраты

В качестве преципитирующих субстратов для пероксидазы используют 4-хлоро-1-нафтол, дающий голубую окраску [31], диаминобензидин, образующий продукт коричневого цвета [31], 3-амино-9-этилкарбазол [32], *l*-фенилендиамина дигидрохлорид-пирокатехин (раствор Хэнкера–Ейтса) [32].

Несмотря на то, что образование нерастворимых соединений при окислении пероксидазой различных фенолов и ароматических аминов широко применяется, упоминание о количественных исследований общего механизма этого процесса в литературе не встречается. Исследователи, как правило, ограничиваются подбором оптимальных условий для конкретной задачи [33]. Единственным, кто довольно подробно исследовал подобные процессы, был Lui с сотр.. В их работах [34, 35] процессы ферментативного образования водорастворимого полимера полианилина всесторонне изучались на разных стадиях его образования. Однако, целью этих работ было изучение условий получения полимеров с заданными свойствами, а не изучение механизма. Известно, что механизм достаточно сложен и является, по существу, окислительной радикальной полимеризацией.

Экспериментальная часть

Оборудование и материалы

В работе использовался атомно-силовой микроскоп P47-SPM-MDT фирмы NT-MDT. Съемка образцов проводилась в контактном режиме с использованием стандартного кантилевера из нитрида кремния. Коэффициент жесткости балки кантилевера равен 0,1, радиус окончания иглы 10 нм, угол при вершине иглы 22°.

Нами использовались следующие материалы и реактивы:

пероксидаза фирмы Boehringer Mannheim

гидрофосфат натрия ч.д.а,

гидроксид натрия ч.д.а.,

3,3'-диаминобензидин (DAB) ч.д.а.

4-хлорнафтол (CN) ч.д.а.

30 % перекись водорода фирмы Merck

высокоориентированный пиролитический графит NT-MDT.

Методика приготовления образцов для АФМ

Фосфатный буферный раствор (рН = 7,4; с = 50mM) готовился путем взвешивания рассчитанного количества гидрофосфата натрия и доведения до рН = 7,4 раствором гидроксида натрия. Полученный раствор хранился при 4°C.

Требуемые концентрации пероксидазы получали точным взвешиванием, растворением в буфере и последующим разведением буфером.

Приготовление субстратов пероксидазы. Взвешивали на аналитических весах 4 мг субстрата (DAB или CN) и растворяли в 1 мл буфера или 96% этилового спирта соответственно. Затем суммарный объем доводили буфером до 4 мл.

Приготовление образцов пероксидазы, адсорбированных на графит. В лунку помещали 230 мкл раствора пероксидазы и пластинку графита размером 5x5 мм со свежей поверхностью. Образцы инкубировались в течение часа с интенсивным встряхиванием. Концентрации пероксидазы варьировались от 10^{-4} мкг/мл до 10^{-1} мкг/мл.

Поверхность графита подготавливалась непосредственно перед использованием, для чего снимался тонкий верхний слой. В случае озонированного графита поверхность графита обновлялась, затем образец помещался в атмосферу озон-кислородной смеси (9% об. озона) на 30 секунд.

После проведения адсорбции образцы промывались дважды 230 мкл фосфатного буфера в течение 15 сек., затем дистиллированной водой, а затем высушивались на воздухе.

Приготовление образцов нерастворимых продуктов пероксидазной реакции.

Пластинки с адсорбированным на них ферментом помещались в 230 мкл раствора субстрат на различное время. После реакции пластинки промывались 2 раза по 230 мкл буфера, водой, а затем сушились на воздухе.

Обсуждение результатов

Независимым методом с использованием «цветной» реакции окисления ТМБ была показана функциональная активность адсорбированной на графите пероксидазы. Данные представлены на рис. 7.

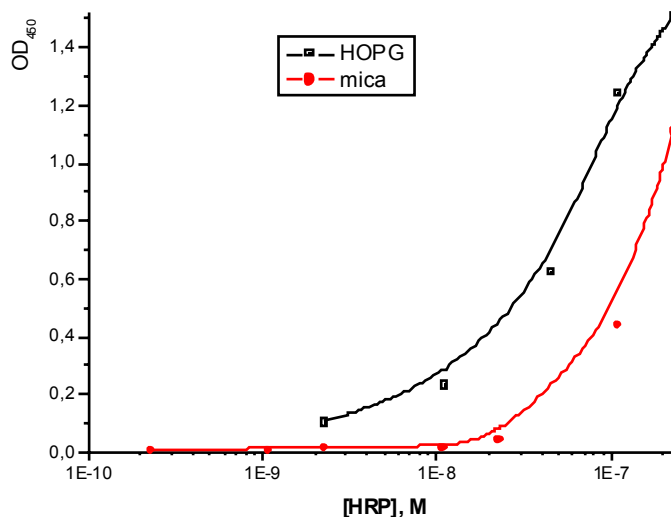


Рис.7. Активность адсорбированной пероксидазы при различных концентрациях фермента во время сорбции.

AFM – исследования поверхности после адсорбции молекул пероксидазы из растворов с концентрацией 10^{-8} М и более показало, что пероксидаза покрывает подложку рыхлым толстым слоем, не дающим возможности следить за реакцией образования полимерных осадков.

Для этого были предприняты попытки прямой визуализации молекул пероксидазы, адсорбированных на подложку графита из раствора с концентрацией 10^{-11} - 10^{-13} М. На полученных изображениях присутствовали характерные вытянутые агрегаты био молекул (рис. 8), которые свидетельствуют о том, что сила адгезии между подложкой и молекулами фермента слишком мала и последние «счищаются» зондом при сканировании.

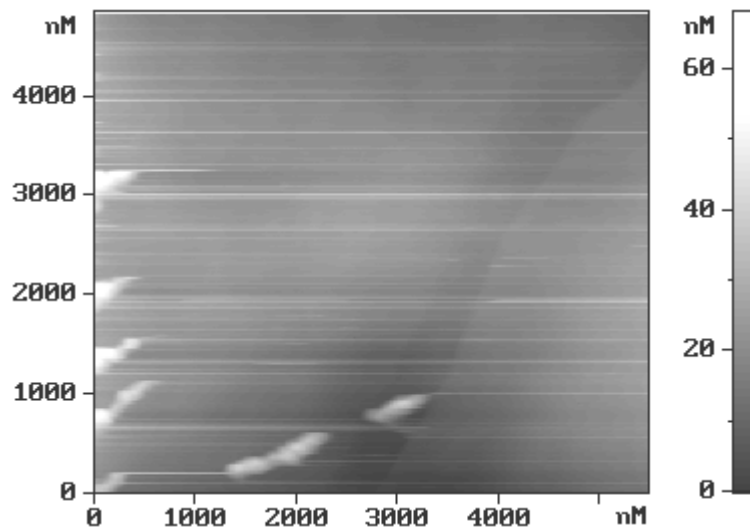


Рис.8. AFM-изображение подложки после адсорбции пероксидазы.

Тогда была предпринята попытка гидрофилизовать свежую поверхность графита путем кратковременной обработки озоном. Однако это также не позволило непосредственно визуализировать молекулы пероксидазы.

Однако наличие молекул пероксидазы на поверхности дало нам основание поставить эксперименты по изучению реакции образования полимерных осадков.

Так, методом AFM были исследованы результаты реакции образования полимерных осадков при окислении хлорнафтола и диаминобензидина.

Данные представлены на рис. 9-14.

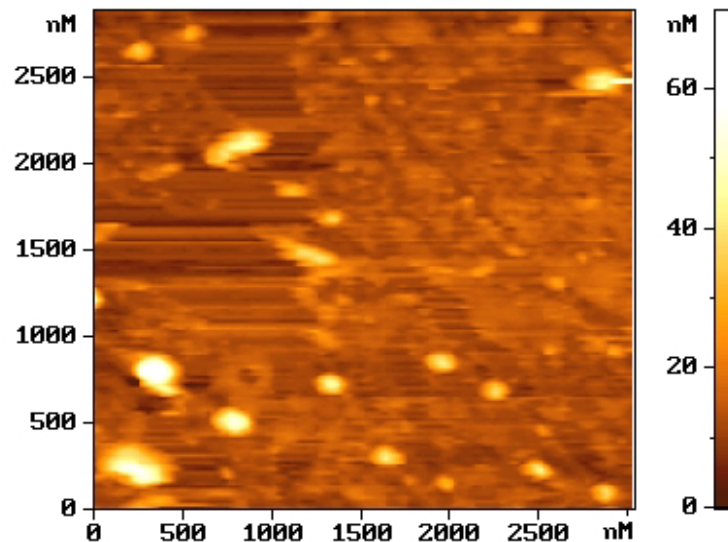


Рис.9 AFM-изображение полимерного осадка.

$C(\text{HRP}) = 0,1 \text{ мкг/мл}$; время реакции 20 минут

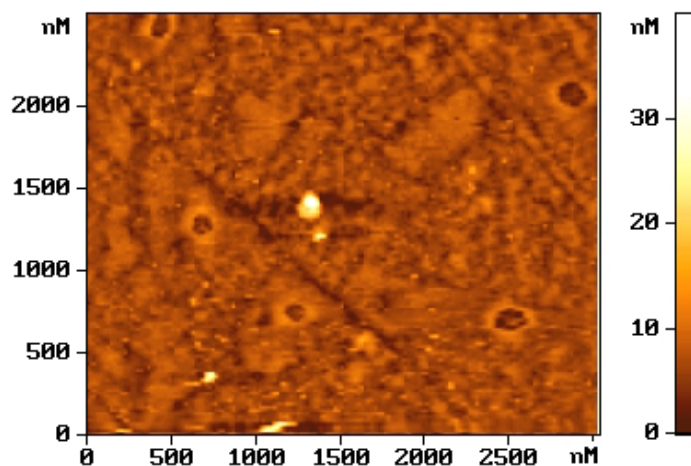


Рис.10 AFM-изображение полимерного осадка.

$C(\text{HRP}) = 0,1 \text{ мкг/мл}$; время реакции 20 минут

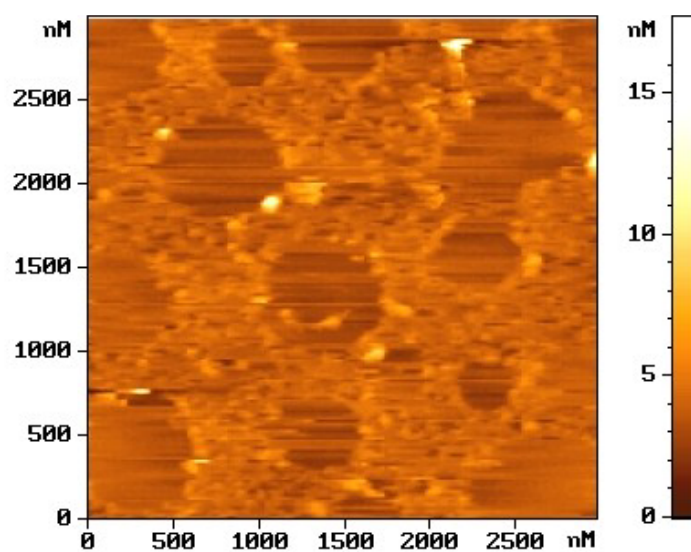


Рис.11 AFM-изображение полимерного осадка.

$C(\text{HRP}) = 0,01 \text{ мкг/мл}$; время реакции 20 минут

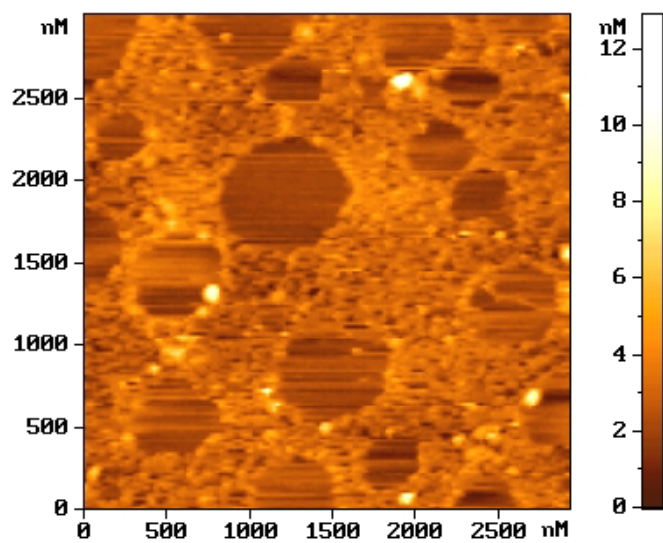


Рис.12 AFM-изображение полимерного осадка.

$C(\text{HRP}) = 0,01 \text{ мкг/мл}$; время реакции 20 минут

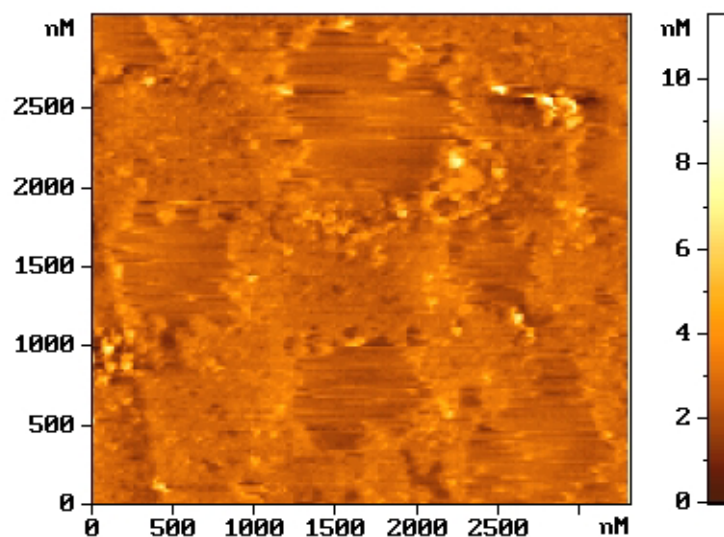


Рис.13 AFM-изображение полимерного осадка.

$C(\text{HRP}) = 0,001$ мкг/мл; время реакции 20 минут

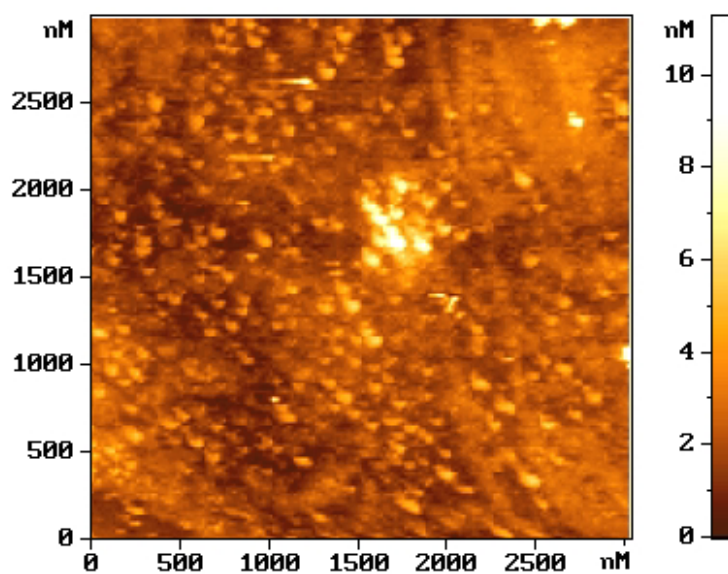


Рис.14 AFM-изображение полимерного осадка.

$C(\text{HRP}) = 0,001$ мкг/мл; время реакции 20 минут

Качественный анализ полученных изображений показывает, что увеличение поверхностной концентрации пероксидазы приводит к образованию более плотных пленок. Это косвенным образом свидетельствует о том, что наблюдаемые пленки образуются в результате ферментативной реакции.

Выводы

1. Освоена методика получения АФМ-изображений в контактном режиме.
2. Разработана методика регистрации полимерных продуктов окисления хлорнафтола перекисью водорода в присутствии адсорбированной на поверхность графита пероксидазы.

Список литературы.

1. Magonov S.N., Whangbo M.-H. Surface analysis with STM and AFM: experimental and theoretical aspects of image analysis.: Weinheim; New York; Basel; Cambridge; Tokyo: VCH, 1996.
2. ЯМИНСКИЙ И.В. // Рос. хим. журн., 1996, т.40, №1, с.111-120.
3. Putman C.A.J., van der Werf K.O., de Grooth B.G., van Hulst N.F., Greve J., Hansma P.K. // Proc. SPIE, 1992, v.1639, pp.198-204.
4. Okusa H., Kurihara K., Kunitake T. // Langmuir, 1994, v.10, №10, pp.3577-3581.
5. Corn R.M., Jordan C.E., Frey B.L., Kornguth S. // Biosens. Bioelect., 1996, v.11, pp.ix-x.
6. Legget G.J., Davies M.C., Jackson D.E., Roberts C.J., Tendler S.J.B., Williams P.M. // J. Phys. Chem., 1993, v.97, pp.8852-8854.
7. Allen S., Chen X., Davies J., Davies M.C., Dawkes A.C., Edwards J.C., Roberts C.J., Sefton J., Tendler S.J.B., Williams P.M. // Biochemistry, 1997, v.36, pp.7457-7463.
8. Davies J., Roberts C.J., Tendler S.J.B // J. Immunol. Methods, 1994, v.167, №1-2, pp.263-269.
9. Karrasch S., Heins S., Aebi U., Engel A. // J. Vac. Sci. Technol., 1994, v.12, №3, pp.1474-1477.
10. Karrasch S., Dolder M., Schabert F., Ramsden J., Engel A. // Biophys. J., 1993, v.65, pp.2437-2446.
11. Matsuda T., Sugawara T. // Langmuir, 1995, v.11, №6, pp.2272-2276.
12. Droz E., Taborelli M., Descouts P., Wells T.N.C. // Biophys. J., 1994, v.67, pp.1316-1323.
13. Droz E., Taborelli M., Wells T.N.C., Descouts P. // Biophys. J., 1993, v.65, №3, pp.1180-1187.
14. Droz E., Taborelli M., Descouts P., Wells T.N.C. // Biophys. J., 1994, v.67, pp.1316-1323.
15. Wagner P., Kern P., Hegner M., Ungewickell E., Semenza G. // FEBS Lett., 1994, v.356, pp.267-271.
16. Wagner P., Hegner M., Gunthrodt H.-J., Semenza G. // Langmuir, 1995, v.11, pp.3867-3875.
17. Rief M., Oesterhelt F., Heymann B., Gaub H.E. // Science, 1997, v.275, pp.1295-1297.
18. Ludwig M., Dettman W., Gaub H.E. // Biophys. J., 1997, v.72, pp.445-448.
19. Egger M., Heyn S.P., Gaub H.E. Two-dimensional recognition pattern of lipid-anchored Fab' fragments. // Biophys. J., 1990, v.57, pp.669-673.
20. Egger M., Ohnesorge F., Weisenhorn A.L., Heyn S.P., Drake B., Prater C.B., Gold S.A.C., Hansma P.K., Gaub H.E. // J. Struct. Biol., 1990, v.103, №1, pp.89-94.

21. Fritz J., Anselmetti D., Jarchow J., Fernandez-Busquets X. // J. Struc. Biol., 1997, v.119, pp.165-171.
22. San Paulo A., Garcia R. // Biophys. J., 2000, v.78, pp.1599-1605.
23. You H.X., Lowe C.R. // J.Coll. Interf. Sc., 1996, v.182, pp.586-601.
24. Weiping Q., Bin X., Leu W., Chunxiao W., Danfeng Y., FangY., Chunwei Y., Yu W. // J. Coll Interf. Sc., 1999, v. 214, pp. 16-19.
25. Kossek S., Padeste C., Tiefenauer L.X., Siegenthaler H. // Biosens. Bioelect., 1998, v.13, pp. 31-43.
26. Ta T. C., Sykes M. T., McDermott M. T. // Langmuir, 1998, v.14, pp.2435-2443.
27. Elofsson C., Dejmeç P., Paulsson M., Burling H. // Int. Dairy J., 1997, v.7, pp.831-819.
28. Schneider S.W., Larmer J., Henderson R.M., Oberleithner H. //Eur. J. Physiol., 1998, v.435, pp.362-367.
29. Maehly A.: Plant Peroxidase, in *Methods in Enzymology, Vol. II*: Academic Press, NY, 1955.
30. Nicell J.A., Wright H. // Enz. Micr. Tech., 1997, v.21, pp. 302-310.
31. Hawkes R., Niday E., Gordon J. // Analyt. Biochem., 1982, v.119, pp.142-147.
32. Джонс Э.Л., Грегори Дж. Иммунопероксидазные методы. в кн.: Антитела. Методы. Кн. 2 /Под ред. Д. Кэтти.: М.: Мир, 1991, с.239-267.
33. Wu Y., Taylor K.E., Biswas N., Bewtra J.K. // Enz. Micr. Tech., 1998, v.22, pp. 315-322.
34. Lui W., Kumar J., Tripathy S., Senecal K.J., Samuelson L. //J. Am. Chem. Soc., 1999, v.121, pp.71-78.
35. Lui W., Cholli A. L., Nagarajan R., Kumar J., Tripathy S., Bruno F.F., Samuelson L. // J. Am. Chem. Soc., 1999, v.121, pp.11345-11355.