

УДК 577.15.03:036

## ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ БИОСЕНСОР НА ОСНОВЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ ПОЛИМЕР-ФЕРМЕНТНЫХ ПЛЕНОК ЛИНЕЙНОГО ПОЛИДИМЕТИЛАМИНОЭТИЛМЕТАКРИ- ЛАТА И ХОЛИНОКСИДАЗЫ

Л.В. Сиголаева<sup>1\*</sup>, А.Ю. Коняхина<sup>1</sup>, Д.В. Пергушов<sup>2</sup>, И.Н. Курочкин<sup>1,3</sup>

*(<sup>1</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; <sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра высокомолекулярных соединений; <sup>3</sup>Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля РАН; \*e-mail: lsigolaeva@belozersky.msu.ru)*

Методом последовательной двухстадийной адсорбции рН- и термочувствительного полимера – линейного полидиметиламиноэтилметакрилата (ПДМАЭМА) – и фермента холиноксидазы (ХО) на графитовых поверхностях сформированы наноразмерные полимер-ферментные пленки. Выявлено влияние условий (рН и температуры), при которых происходит нанесение на графитовую поверхность полимера, на электрохимические отклики полимер-ферментных сенсорных конструкций и кинетические параметры ферментативного окисления холина под действием ХО, включенной в состав полимер-ферментных пленок. Установлено, что стимулчувствительность ПДМАЭМА позволяет контролировать свойства образуемых полимерных покрытий (степень заполнения поверхности, толщину покрытия и шероховатость), которые оказывают определяющее влияние на количество связываемой ХО и, как следствие, на конечные электрохимические характеристики полимер-ферментных сенсорных конструкций.

**Ключевые слова:** стимулчувствительность, термочувствительный полимер, полиэлектролит, модификация поверхности, адсорбция, тонкие пленки, биосенсор, полидиметиламиноэтилметакрилат, холиноксидаза, электрохимия, атомно-силовая микроскопия.

**Список сокращений:** ПДМАЭМА – полидиметиламиноэтилметакрилат, ХО – холиноксидаза,  $T_{п}$  – температура помутнения, НКТР – нижняя критическая температура растворения, ПГЭ – планарный графитовый электрод, ВОПГ – высокоориентированный пиролитический графит, АСМ – атомно-силовая микроскопия.

Адсорбция биомолекул представляет собой один из наиболее простых способов закрепления (фиксации) биообъектов на поверхностях, который в настоящее время активно применяется для формирования сенсорных покрытий, в том числе и электрохимических [1]. В последние годы все возрастающее число теоретических и экспериментальных работ посвящается исследованию электростатической адсорбции биообъектов, при которой они связываются противоположно заряженной поверхностью. Отметим, что для придания поверхности необходимого заряда широко используются разные соединения, в частности высокомолекулярные, содержащие в своем составе ионогенные группы [2, 3]. Они могут весьма эффективно связывать противоположно заряженные биомолекулы, способствуя иммобилизации биообъектов на поверхности.

Как было продемонстрировано нами в цикле работ [4–10], упомянутый выше подход можно успешно использовать для создания высокочувствительных электрохимических биосенсоров на основе полимер-ферментных пленок, формируемых на графитовых (проводящих) поверхностях. Такие пленки могут быть легко получены путем последовательной (двухстадийной) адсорбции, при которой осуществляют нанесение сначала полимерного компонента (первая стадия), а затем молекул фермента (вторая стадия). Отметим, что вторую стадию проводят в условиях, при которых биообъект и полимерный компонент являются противоположно заряженными. Главное и несомненное достоинство данного подхода заключается в прочной (многоточечной) фиксации биомолекул за счет электростатического связывания с адсорбированным на поверхности противоположно заряженным по-

лимером. Количество связываемого фермента зависит от структуры (морфологии) сформированной на предыдущей стадии полимерной пленки и ее толщины, а при несплошном покрытии определяется прежде всего степенью заполнения исходной поверхности полимером. Таким образом, стадия нанесения (адсорбции) полимерного компонента является ключевой для формирования высокоактивных (т.е. содержащих значительное количество иммобилизованного фермента) полимер-ферментных покрытий.

Проведенные нами ранее исследования показали, что адсорбция сильных полиэлектролитов, таких как полидиметилдиаллиламмоний хлорид, на графитовых поверхностях не позволяет получать сплошные полимерные пленки [6]. Высокая плотность заряда уже адсорбировавшихся макромолекул препятствует дальнейшей адсорбции последующих. Кроме того, адсорбция сильнозаряженных полимеров дополнительно затрудняется вследствие их чрезвычайно плохой адгезии к графитовым поверхностям. Это приводит к формированию полимерных покрытий с несплошной (островковой или сетчатой) морфологией [4, 6]. Некоторого улучшения эффективности адсорбции сильных полиэлектролитов на подобных поверхностях можно добиться, если проводить ее в присутствии низкомолекулярных солей, ионы которых способны эффективно экранировать заряд полимерного компонента, например йодидов щелочных металлов, в случае использования для модификации графитовой поверхности полидиметилдиаллиламмоний хлорида [6].

Весьма перспективными для модификации графитовых поверхностей методом адсорбции оказались стимулчувствительные полимеры, которые способны изменять свой гидрофильно-гидрофобный баланс при изменении внешнего стимула, в первую очередь рН и температуры. Так, в недавних работах [7–11] описан способ формирования полимерных покрытий из рН- и термочувствительных сополимерных микрогелей на основе поли-N-изопропилакриламида. Было установлено, что адсорбция микрогелей на гидрофобных, в частности графитовых, поверхностях протекает наиболее эффективно в том случае, когда их частицы находятся в гидрофобизованном состоянии, т.е. незаряжены (или слабозаряжены) и в достаточной степени дегидратированы. Подобной гидрофобизации микрогелей достигают выбором соответствующего

значения рН и температуры, при которых происходит их нанесение из водного раствора на поверхность. Отметим, что высокая емкость (микро)гелей по отношению к включаемым в них соединениям (в том числе и биологически активным) в сочетании со стимулчувствительностью таких полимерных объектов позволяет создавать на их основе «умные» системы для медицинского и биотехнологического применения [11–15].

Полидиметиламиноэтилметакрилат (ПДМАЭМА) также представляет собой рН-чувствительный полимер, являющийся слабым полиоснованием, каждое мономерное звено которого содержит третичную аминогруппу. В протонированном состоянии он способен взаимодействовать с отрицательно заряженными соединениями, в том числе и биомолекулами. В частности, (со/тер)полимеры на основе ПДМАЭМА успешно используют для доставки генетического материала в клетку [16–18]. Кроме того, ПДМАЭМА относится к термочувствительным полимерам, причем его нижняя критическая температура растворения (НКТР) зависит от рН окружающей водной среды [19, 20]. Таким образом, гидрофильно-гидрофобный баланс этого полимера можно эффективно изменять, варьируя как рН, так и температуру его водного раствора. В работах [19, 20] показано, что уменьшение рН, приводящее к повышению заряда ПДМАЭМА вследствие протонирования его мономерных звеньев, сопровождается увеличением НКТР.

Можно полагать, что подобная рН-зависимая термочувствительность ПДМАЭМА позволит, как и в случае рН- и термочувствительных микрогелей, подбирать условия для наиболее эффективной модификации графитовых поверхностей. В то же время в отличие от вышеупомянутых микрогелей данный полимер обладает гораздо более высокой плотностью заряда, что может обеспечить прочное связывание им значительно большего количества глобул противоположно заряженного фермента. Еще одним весьма важным преимуществом ПДМАЭМА является простота его синтеза и коммерческая доступность.

Отметим, что к настоящему времени в литературе присутствует лишь сравнительно небольшое число упоминаний о биосенсорах, в состав которых входит ПДМАЭМА (в основном в качестве блока в составе диблок-сополимеров) [4, 5, 21–23]. Основное

внимание в этих работах уделено влиянию рН-чувствительности ПДМАЭМА на формирование полимерных пленок, в то время как влияние его термочувствительности осталось, по существу, не выявленным.

В данной работе изучены особенности формирования наноразмерных полимер-ферментных пленок на основе ПДМАЭМА и холиноксидазы (ХО), выбранной в качестве модельного фермента. Особое внимание уделено тому, какие рН- и температурные условия при адсорбции ПДМАЭМА необходимо использовать для получения на графитовых поверхностях высокоемких полимерных пленок, способных связывать значительное количество ХО. Кроме того, в рамках настоящей работы продемонстрировано применение полимер-ферментных покрытий на графитовых электродах в качестве сенсоров для анализа холина.

### Экспериментальная часть

**Материалы.** Холиноксидаза (ХО) из *Alcaligenes sp.*, Е.С. 1.1.3.17, активность 12 ед./мг, хлорид холина, натриевая соль 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-этансульфоновой кислоты (ХЕПЕС), трис(гидроксиметил)аминометан (ТРИС) и гидрохлорид трис(гидроксиметил)аминометана (ТРИС-НСl) были получены от фирмы «Sigma-Aldrich» (Германия). Линейный полидиметиламиноэтилметакрилат (ПДМАЭМА) с  $M_n = 87550$  г/моль был любезно предоставлен проф. Акселем Мюллером (Университет г. Байройт, Германия). Перманганат калия и четырехводный ацетат марганца были закуплены у фирм «Merck» (Германия) и «Acros» (Бельгия) соответственно. В качестве растворителя использовали воду Milli-Q (18,2 М $\Omega$  × см), получаемую с помощью системы очистки воды «Milli-Q» («Millipore», Германия).

**Приготовление водных растворов.** Водные растворы ПДМАЭМА готовили путем растворения сухого полимера при длительном перемешивании в 10 мМ ТРИС с требуемым значением рН. При необходимости значения рН приготовленных растворов корректировали с помощью 0,1 М НСl или 0,1 М NaOH. Водный раствор ХО готовили путем растворения фермента в 10 мМ ТРИС с рН 7.

**Потенциометрическое титрование.** Потенциометрическое титрование водного раствора ПДМАЭМА проводили с помощью рН-метра («Orion», Германия), оснащенного комбинированным стеклянным электродом, который калибровали по стандартным буферным раство-

рам с рН 4, рН 7 и рН 10 («Orion», Германия). Титрование осуществляли, добавляя по 10 мкл 10 мМ НСl к раствору полимера с концентрацией 0,005 основомоль/л (0,785 г/л) при постоянной температуре 25 °С и непрерывном перемешивании. Каждое значение рН регистрировали по достижении им постоянной величины после добавления очередной порции титранта. Из полученных данных получали зависимость степени протонирования ПДМАЭМА ( $\alpha$ ) от рН его водного раствора. Для вычисления значений  $pK_a$ , где  $K_a$  представляет собой константу диссоциации протонированного мономерного звена данного полимера, при разных значениях  $\alpha$  использовали уравнение Хассельбаха–Гендерсона.

**Турбидиметрия.** Измерение мутности водных растворов ПДМАЭМА с концентрацией 0,1 г/л (рН 8, рН 9 или рН 10) проводили на спектрофотометре «CARY 100 Bio UV-visible» («Agilent», США) в термостатируемом кюветном отделении при длине волны 500 нм. Светопропускание растворов полимера регистрировали в циклах нагревание-охлаждение при скорости изменения температуры 0,4 град/мин. Температуру помутнения ( $T_{\text{п}}$ ) определяли как точку излома на соответствующей зависимости светопропускания от температуры при нагревании водных растворов ПДМАЭМА.

**Атомно-силовая микроскопия.** Анализ морфологии пленок ПДМАЭМА проводили методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). Образцы для измерений готовили, нанося на 30 минут каплю водного раствора ПДМАЭМА с концентрацией 1 г/л в 10 мМ ТРИС при соответствующем значении рН и заданной температуре на свежесколотую поверхность (5 × 10 мм) высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ). По истечении указанного времени приготовленные образцы осторожно промывали водой (18,2 М $\Omega$  × см) при соответствующей температуре, а излишки влаги удаляли фильтровальной бумагой. Все вышеперечисленные действия проводили в камере с контролируемой температурой при относительной влажности 60%. Перед измерениями образцы пленок ПДМАЭМА выдерживали в эксикаторе с силикагелем в течение как минимум 1 ч. Сканирование проводили на атомно-силовом микроскопе «NT-MDT Integra Prima SPM» («NT-MDT», Россия) в полуконтактном режиме на воздухе с использованием кантилеверов из Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> (fpN11S, Институт физических проблем имени Ф.В. Лукина, Зеленоград, Россия), радиус кривизны иглы и резонансная частота составляли 10–25 нм и 190–325 кГц

соответственно. Полученные результаты представлены в виде изображений размером  $3 \times 3$  мкм, выбираемых на основании как минимум трех сканов с разных мест образца. Изображения анализировали в программе Image Analysis 3 («NT-MDT», Россия).

**Формирование полимер-ферментных пленок.** Для электрохимических измерений ферментативной активности полимер-ферментные пленки наносили на планарные графитовые электроды (ПГЭ), изготавливаемые методом трафаретной печати путем нанесения проводящей графитовой пасты («Gwent», Великобритания) на подложку из поливинилхлорида толщиной 0,2 мм через трафарет с размером ячеек сетки 200 меш. Каждый электрод состоял из круглой рабочей зоны диаметром 3 мм, проводящей дорожки ( $30 \times 1,5$  мм) и прямоугольного окончания ( $3 \times 7$  мм), которое обеспечивало электрический контакт. Для придания ПГЭ пероксидочувствительных свойств их предварительно модифицировали слоем медиатора  $MnO_2$ . Золь  $MnO_2$  получали, смешивая водные растворы 0,25 мМ  $KMnO_4$  и 0,375 мМ  $Mn(CH_3COO)_2$  в соотношении 1:1, а затем перемешивая смесь на вортексе V-1 plus («Biosan», Латвия) в течение 5 минут. Далее рабочую зону электрода покрывали золем  $MnO_2$ , после чего его полностью высушивали в течение примерно 40 минут при комнатной температуре. После этого поверхность ПГЭ промывали водой ( $18,2$  М $\Omega \times$  см) и сушили при  $60^\circ C$  в течение 1 ч. Адсорбцию ПДМАЭМА проводили, погружая электрод на 40 минут в раствор полимера при соответствующем значении pH и температуры. Температуру нанесения ПДМАЭМА контролировали с помощью термощейкера для пробирок («Eppendorf», Германия). По истечении указанного времени ПГЭ промывали водой ( $18,2$  М $\Omega \times$  см) и сушили в потоке воздуха в течение 1–2 с. Сразу же после этого на модифицированный электрод наносили ХО из водного раствора с концентрацией фермента  $5 \times 10^{-5}$  М в 10 мМ ТРИС буфере с pH 7. Затем повторяли процедуру промывки и сушки. В целях предотвращения потери ферментативной активности ПГЭ с нанесенными на них полимер-ферментными пленками до измерений хранили при  $+4^\circ C$ .

**Амперометрический метод измерения отклика электрода.** Электрохимические измерения проводили при комнатной температуре в двухэлектродной электрохимической ячейке объемом 1 мл при непрерывном перемешивании.

В качестве рабочего электрода использовали ПГЭ с нанесенной полимер-ферментной пленкой. Площадь активной поверхности рабочего электрода составляла  $0,049$  см<sup>2</sup>. Электродом сравнения служил серебряный электрод (длина 1 см, диаметр 3 мм, площадь поверхности  $1,03$  см<sup>2</sup>), покрытый электрохимически осажденным слоем хлорида серебра. Электрохимические измерения проводили на микропотенциостате «IPC-Micro» («Kronas Ltd.», Россия), используя поставляемое вместе с микропотенциостатом программное обеспечение. Отклики полимер-ферментных пленок регистрировали в 50 мМ ХЕПЕС с 30 мМ KCl (pH 7,5), измеряя силу тока в ответ на введение субстрата (холина). Силу тока, генерируемого при окислении пероксида водорода при заданном потенциале ( $+480$  мВ относительно электрода сравнения Ag/AgCl), считали прямо пропорциональной концентрации введенного субстрата/активности фермента. Аналитический сигнал ПГЭ определяли как разность стационарных значений силы тока до и после добавления аналита.

### Результаты и их обсуждение

Формирование наноразмерных полимер-ферментных пленок на поверхности планарных графитовых электродов (ПГЭ) осуществляли способом двухстадийной адсорбции. В этом случае на первой стадии происходит нанесение полимера. После соответствующей стадии отмывки поверхности от слабосвязавшихся макромолекул и удаления избытка влаги проводили вторую стадию, представляющую собой нанесение фермента, которая также сопровождается отмывкой и сушкой. Согласно опубликованным ранее работам [4, 5, 7–10], при данном способе модификации поверхности электродов первая стадия (адсорбция полимерного компонента) является определяющей: от эффективности модификации исходной графитовой поверхности полимером зависит количество связываемого на последующей (второй) стадии фермента и, как результат, конечная ферментативная активность получаемых полимер-ферментных покрытий. При этом эффективной модификации электродов можно достичь, используя стимулчувствительные полимеры, гидрофильно-гидрофобный баланс которых можно варьировать (задавать), изменяя условия окружающей водной среды, в первую очередь, pH и температуру.

Как известно, полидиметиламиноэтилметакрилат (ПДМАЭМА) является слабым полиэ-

лектролитом и проявляет рН-зависимую термочувствительность в водных средах [19, 20]. Стимулчувствительность этого полимера можно использовать для формирования покрытий, способных (в протонированном состоянии) связывать значительные количества противоположно заряженных глобул фермента. В настоящей работе рН- и термочувствительные свойства использованного образца ПДМАЭМА были подробно охарактеризованы нами методами потенциометрического титрования и турбидиметрии.

Каждое мономерное звено ПДМАЭМА содержит третичную аминогруппу, которая способна протонироваться при понижении рН окружающей водной среды. На рис. 1 представлена типичная кривая потенциометрического титрования водного раствора этого полимера. Видно, что ПДМАЭМА переходит из полностью депротонированного (незаряженного) состояния при рН 8,8 ( $\alpha = 0$ ) в полностью протонированное (заряженное) состояние при рН 4,3 ( $\alpha = 1$ ). Полученные с помощью уравнения Хассельбаха–Гендерсона значения  $pK_a^{\text{характ.}}$  ( $\alpha \rightarrow 0$ ) и  $pK_a^{\alpha = 0,5}$  ( $\alpha = 0,5$ ) составили 6,73 и 6,41 соответственно, что хорошо согласуется с опубликованными ранее данными [20, 22, 24].

Как уже было отмечено выше, ПДМАЭМА относится к термочувствительным полимерам, обладающим нижней критической температурой растворения (НКТР) [19, 20]. Турбидиметрические эксперименты, проведенные при заданной (фиксированной) концентрации полимера, позволяют определить так называемую температуру помутнения его водных растворов ( $T_{\text{п}}$ ). Из представленной на рис. 2 турбидиметрической кривой видно, что нагревание приводит к помутнению водного раствора ПДМАЭМА при превышении температурой некоторого значения  $T_{\text{п}}$  (показано стрелкой на рис. 2). Охлаждение, наоборот, приводит к полному восстановлению прозрачности раствора полимера. Этот результат указывает на обратимость процесса фазового разделения в данной системе, хотя при этом наблюдается отчетливое проявление гистерезиса (несовпадения кривых и точек изломов при нагревании и при охлаждении в цикле нагревание-охлаждение).

Ранее в работах [19, 20] было показано, что термочувствительность ПДМАЭМА зависит от рН его водного раствора. Определенные нами значения  $T_{\text{п}}$  для этого полимера составили 51, 43 и 37 °С при значениях рН, равных 8, 9 и 10 соответственно. Подобное влияние рН на термо-

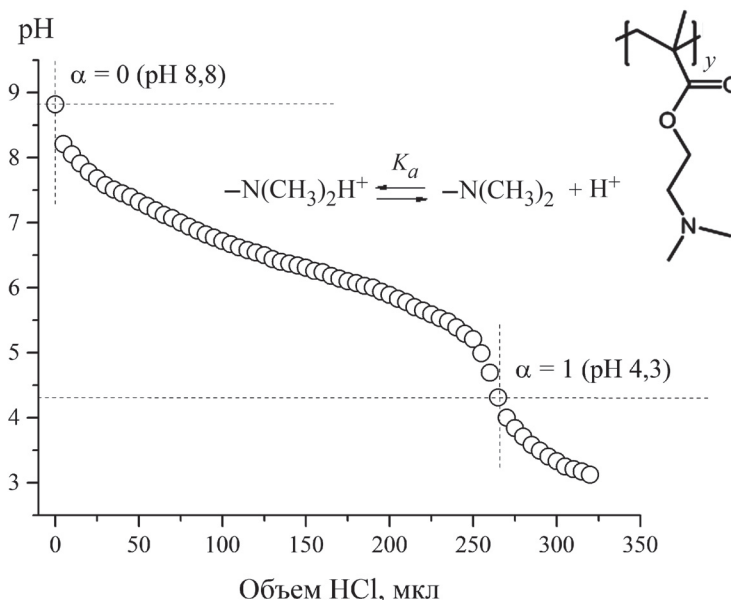


Рис. 1. Зависимость рН раствора ПДМАЭМА от количества добавленного титранта (10 мМ НСl). Титрование проводили при 25 °С путем последовательного добавления 10 мМ НСl порциями по 10 мкл к водному раствору ПДМАЭМА с концентрацией полимера 0,005 основомоль/л. На врезке приведена структурная формула ПДМАЭМА

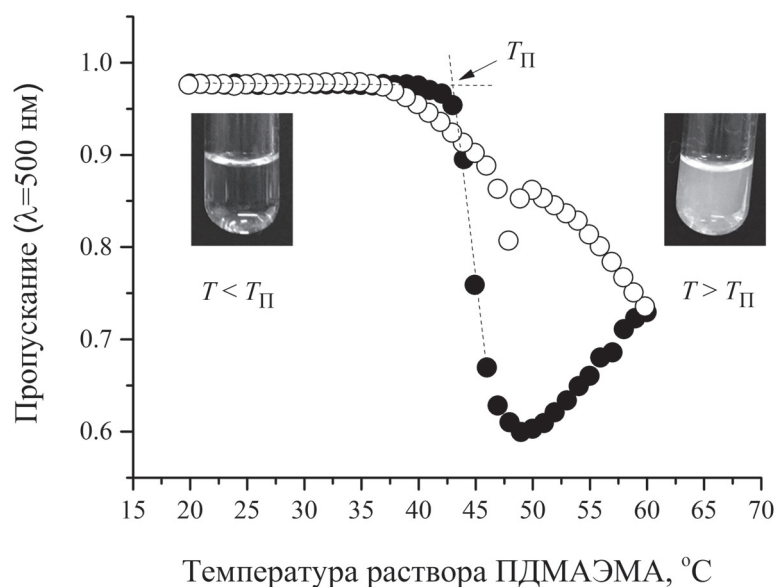


Рис. 2. Температурная зависимость светопропускания водного раствора ПДМАЭМА с концентрацией полимера 0,1 г/л при pH 9 в цикле нагревание-охлаждение. Закрытые и открытые символы относятся к значениям светопропускания при нагревании и охлаждении соответственно. На фотографиях показан внешний вид раствора ПДМАЭМА при  $T < T_{\Pi}$  и  $T > T_{\Pi}$

чувствительность ПДМАЭМА обусловлено зарядением (протонированием) его мономерных звеньев, препятствующим коллапсу и агрегации макромолекул при повышении температуры. Отметим, что даже незначительное протонирование ПДМАЭМА приводит к сдвигу его фазового перехода в область более высоких температур, при этом возрастание мутности водных растворов ПДМАЭМА при фазовом разделении выражено намного слабее.

На основании полученных данных по исследованию pH- и термочувствительных свойств ПДМАЭМА в водных средах можно полагать, что его взаимодействие с гидрофобными поверхностями будет происходить наиболее эффективно в сильнощелочных средах ( $\alpha \rightarrow 0$ ) и при повышенной температуре ( $T > T_{\Pi}$ ), т.е. в условиях, когда полимер находится в незаряженном и существенно дегидратированном состоянии. Можно ожидать, что при последующем подкислении окружающей водной среды адсорбированные макромолекулы ПДМАЭМА будут заряжаться вследствие протонирования их мономерных звеньев и приобретать способность связывать глобулы ферментов с низкими изоэлектрическими точками.

Для проверки этого предположения путем последовательной (двухстадийной) адсорб-

ции на поверхности ПГЭ были сформированы полимер-ферментные покрытия на основе ПДМАЭМА и холиноксидазы (ХО), выбранной в качестве модельного фермента. Процесс формирования полимер-ферментных пленок схематически изображен на рис. 3, А. Отметим, что поверхность электродов предварительно модифицировали наночастицами диоксида марганца (медиатор) для придания им пероксидочувствительных свойств [4–6, 8, 10]. Специально проведенные эксперименты показали, что наносимый тонкий слой медиатора не оказывает существенного влияния на физико-химические свойства поверхности ПГЭ, которая характеризуется небольшим отрицательным зарядом и значительной шероховатостью [9–11].

Адсорбцию ПДМАЭМА на ПГЭ/MnO<sub>2</sub> проводили при разных значениях pH ( $5 \leq \text{pH} \leq 10$ ) и температуры ( $25 \text{ °C} \leq T \leq 60 \text{ °C}$ ). После нанесения полимера электрод промывали водой и обдували воздухом для удаления слабосвязанных макромолекул и каплей раствора. Связывание ХО ( $pI = 4,3$ ) осуществляли при 20 °C и pH 7. Выбор этих условий был продиктован необходимостью сохранения pH- и термостабильности фермента. При pH 7 часть аминокрупп ПДМАЭМА протонирована ( $\alpha = 0,28$ ) и его макромолекулы, адсорбированные на ПГЭ/MnO<sub>2</sub>, способны связывать

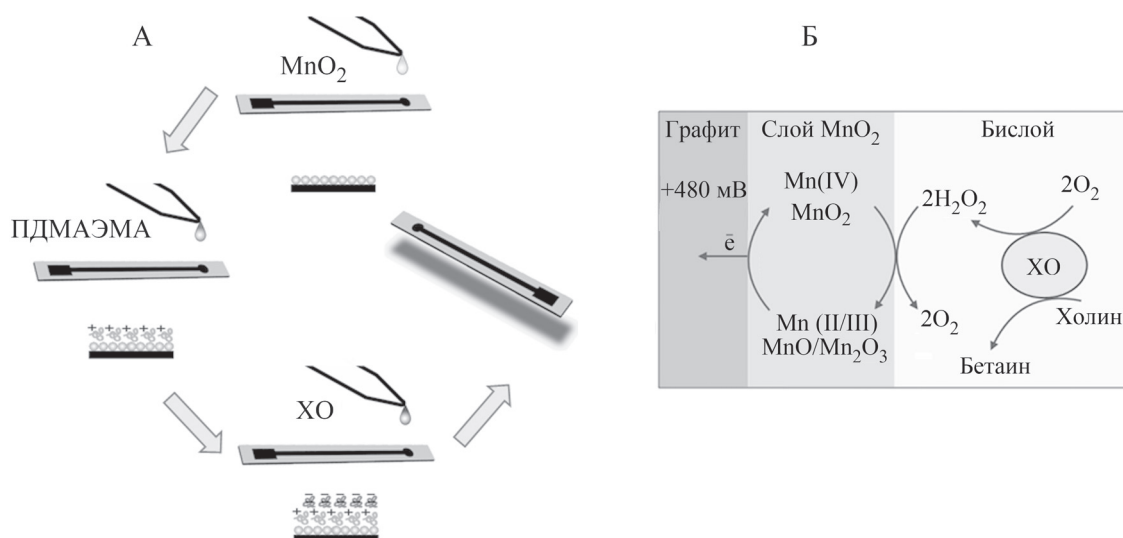


Рис. 3. Способ формирования сенсорной поверхности (А) и принцип амперометрического анализа холина (Б) с помощью биосенсора ПГЭ/ $MnO_2$ /ПДМАЭМА/ХО

ХО, глобулы которой при данном значении рН несут отрицательный заряд.

Электрохимические отклики приготовленных полимер-ферментных покрытий измеряли, используя холин в качестве субстрата (при стандартной концентрации  $10^{-5}$  М). При ферментативном окислении холина кислородом воздуха в присутствии ХО происходит выделение пероксида водорода. Медиаторное окисление последнего, происходящее при участии  $MnO_2$  (при +480 мВ относительно референсного электрода  $Ag/AgCl$ ), генерирует ток электроокисления, сила которого пропорциональна количеству наработавшегося пероксида водорода, а следовательно, количеству и активности ХО в полимер-ферментной пленке. Принцип амперометрического определения холина представлен на рис. 3, Б.

На рис. 4 показаны полученные зависимости электрохимических откликов биосенсорных конструкций ПГЭ/ $MnO_2$ /ПДМАЭМА/ХО в зависимости от рН (рис. 4, А) и температуры (рис. 4, Б) водного раствора ПДМАЭМА, который использовали для нанесения полимера. Видно, что увеличение значения рН, при котором осуществлялась адсорбция ПДМАЭМА, от 5 до 10 приводит к значительному увеличению амперометрических откликов полимер-ферментных покрытий (рис. 4, А). В то же время амперометрические отклики практически не изменяются при увеличении температуры адсорбции ПДМАЭМА от 25 до 60 °С (рис. 4, Б), при этом

их воспроизводимость заметно ухудшается в области повышенных температур ( $T > 40$  °С).

Для дополнительной характеристики полимер-ферментных покрытий, сформированных при различных условиях нанесения ПДМАЭМА на ПГЭ/ $MnO_2$ , были получены зависимости начальной скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в широком диапазоне концентраций холина. Условия адсорбции ПДМАЭМА (рН 7/25 °С; рН 10/25 °С и рН 10/60 °С) выбирали так, чтобы продемонстрировать влияние рН и температуры, при которых происходило формирование полимерного слоя, на характеристики ферментативного процесса. Из полученных зависимостей амперометрических откликов биосенсорных конструкций ПГЭ/ $MnO_2$ /ПДМАЭМА/ХО от концентрации холина (рис. 5) были определены параметры уравнения Михаэлиса–Ментен ( $K_M$  и  $V_{MAX}$ ), характеризующие связывающую и каталитическую функции ХО в составе полимер-ферментных пленок. В таблице показано, что условия нанесения ПДМАЭМА оказывают основное влияние на  $V_{MAX}$ , в то время как константа Михаэлиса  $K_M$  изменяется незначительно или не изменяется вовсе. Вероятно, электростатическое взаимодействие ХО с ПДМАЭМА не вызывает существенного изменения конформации активного центра фермента. Поэтому все наблюдаемые изменения сенсорных откликов, как и кинетические параметры ферментативного процесса с участием полимер-ферментных пленок, следует отнести

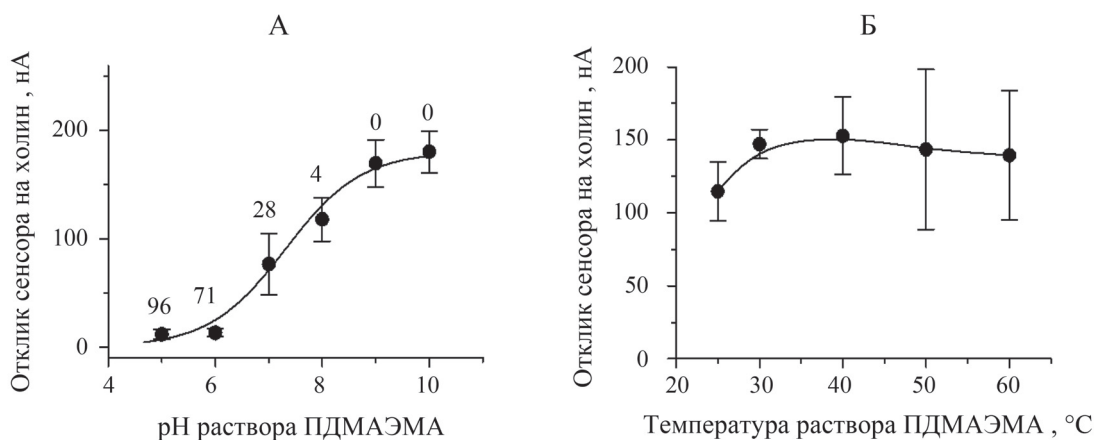


Рис. 4. Зависимость амперометрических откликов биосенсорных конструкций ПГЭ/MnO<sub>2</sub>/ПДМАЭМА/ХО от pH раствора, из которого происходила адсорбция ПДМАЭМА ( $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) (А), и от температуры раствора, из которого происходила адсорбция ПДМАЭМА (pH 9) (Б). Цифрами указаны значения степени протонирования  $\alpha$  (%) ПДМАЭМА, рассчитанные по данным потенциометрического титрования (рис. 1). Условия адсорбции: Стадия 1 – 1 г/л ПДМАЭМА в 10 мМ ТРИС при различных значениях pH (А) и температуры (Б), время адсорбции 40 мин; Стадия 2 – 4 г/л ХО в 10 мМ ТРИС при pH 7, время адсорбции 10 мин. Электрохимические отклики измеряли при стандартной концентрации холина  $10^{-5}\text{ М}$

только к различиям в количестве связанной полимером ХО. Это количество непосредственно зависит от структуры/морфологии пленки ПДМАЭМА, а также ее адгезии к ПГЭ/MnO<sub>2</sub>.

Для понимания влияния pH и температуры на адсорбцию ПДМАЭМА и объяснения поведения формируемых биосенсорных конструкций были привлечены данные атомно-силовой микроскопии (АСМ). Этот метод позволяет визуализировать морфологию пленок ПДМАЭМА, нанесенных при различных условиях на поверхность высокоориентированного пиролитического графита (ВОПГ). В частности, методом АСМ была исследована топография пленок, формируемых при адсорбции ПДМАЭМА на ВОПГ при pH 3 ( $\alpha = 1$ ) и pH 9 ( $\alpha = 0$ ) при двух различных значениях температуры  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $T < T_{\text{П}}$ ) и  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $T > T_{\text{П}}$ ). Сканирование приготовленных образцов проводили в высушенном состоянии на воздухе.

Полученные изображения показывают, что полимер, нанесенный при pH 3 ( $\alpha = 1$ ) и  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $T < T_{\text{П}}$ ), собирается на поверхности ВОПГ в каплевидные структуры, при этом большая ее часть остается незаполненной (степень заполнения поверхности не превышает 13%) (рис. 6, А). Действительно, полностью протонированные макромолекулы ПДМАЭМА стремятся минимизировать площадь контакта с гидрофобной поверхностью графита, образуя несплошные пленки с островковой морфологией. Формиро-

вание подобных пленок типично при адсорбции сильнозаряженных полимеров на гидрофобных поверхностях и наблюдалось нами ранее [4, 6]. Сканирование полимерной пленки, сформированной при pH 9 ( $\alpha = 0$ ) и  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $T < T_{\text{П}}$ ), свидетельствует о том, что адсорбция незаряженных макромолекул ПДМАЭМА приводит к образо-

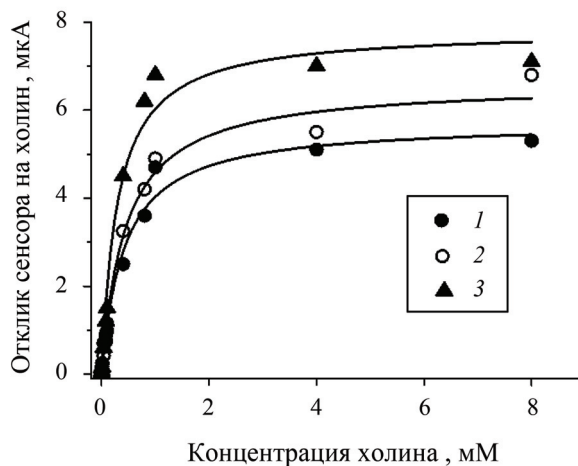


Рис. 5. Зависимости амперометрических откликов биосенсорных конструкций ПГЭ/MnO<sub>2</sub>/ПДМАЭМА/ХО, формируемых при различных условиях нанесения ПДМАЭМА, от концентрации холина. Условия: адсорбции: Стадия 1 – pH 7 и  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (1), pH 10 и  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (2), pH 10 и  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (3), 1 г/л ПДМАЭМА в 10 мМ ТРИС, время адсорбции 40 мин; Стадия 2 – 4 г/л ХО в 10 мМ ТРИС при pH 7, время адсорбции 10 мин



**Кинетические параметры ферментативного окисления холина полимер-ферментными пленками ПДМАЭМА/ХО, формируемыми на поверхности ПГЭ/МnO<sub>2</sub> при различных условиях адсорбции ПДМАЭМА**

Кинетические параметры	Условия адсорбции ПДМАЭМА		
	рН 7 25 °С	рН 10 25 °С	рН 10 60 °С
$K_M$ , мМ	0,42 ± 0,06	0,44 ± 0,06	0,31 ± 0,07
$V_{MAX}$ , А	5730 ± 200	6620 ± 250	7830 ± 280

ванию полунепрерывной пленки, равномерно покрывающей поверхность ВОПГ (рис. 6, Б). Средняя шероховатость ( $R_a$ ) полученной пленки составляет 0,662 нм, средняя толщина равна 2,5–3,0 нм, а степень заполнения поверхности изменялась от 63 до 100% в зависимости от места сканирования.

При адсорбции этого же полимера в незаряженном состоянии при рН 9 ( $\alpha = 0$ ) и 50 °С ( $T > T_{II}$ ) образуется еще более плотная и гладкая пленка (рис. 6, В). Ее средняя шероховатость ( $R_a$ ) составляет 0,374 нм, средняя толщина равна 2,0–2,5 нм, а степень заполнения поверхности изменяется от 91 до 100% в зависимости от места сканирования. Помимо этого отчетливо видно, что на изображении также присутствует некоторое число крупных объектов с высотой до 15 нм (светлые объекты на рис. 6, В). Это может служить указанием на то, что при повышенной температуре в водном растворе ПДМАЭМА вследствие гидрофобизации его макромолекул начинают формироваться агрегированные структуры.

Результаты, полученные методом АСМ, позволяют объяснить вид зависимостей откликов биосенсорных конструкций ПГЭ/МnO<sub>2</sub>/ПДМАЭМА/ХО от условий нанесения полимера. Так, согласно представленным на рис. 6, А, Б данным, степень протонирования ПДМАЭМА оказывает определяющее влияние на эффективность модификации им поверхности ПГЭ/МnO<sub>2</sub>. Действительно, степень заполнения поверхности полимерной пленкой, сформированной при адсорбции полностью заряженного (протонированного) ПДМАЭМА ( $\alpha = 1$  при рН 3) (рис. 6, А) составляет не более 13%. Это в несколько раз меньше, чем при нанесении полностью незаряженного (депротонированного) ПДМАЭМА ( $\alpha = 0$  при рН 9) (рис. 6, Б). Эффективность модификации графитовой поверхности полимером на первой стадии формирования полимер-ферментной пленки, вероятно, определяет количество связываемого на второй стадии фермента (рис. 3, А). Именно этим можно объяснить вид представленной на рис. 4, А зависимости амперометрических откликов биосенсорных кон-

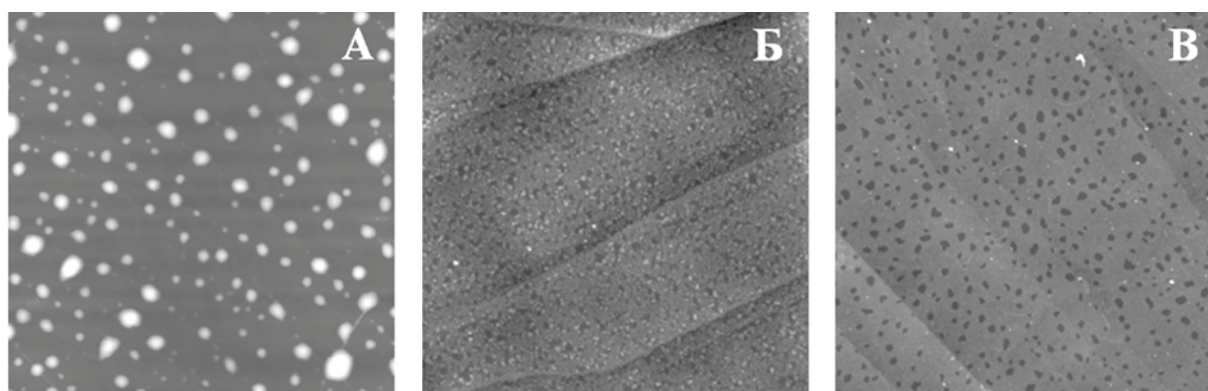


Рис. 6. Полученные методом атомно-силовой микроскопии изображения пленок ПДМАЭМА, сформированных при 25 °С и рН 3 ( $\alpha = 1$ ) (А); 25 °С и рН 9 ( $\alpha = 0$ ) (Б) и 50 °С и рН 9 ( $\alpha = 0$ ) (В). Условия адсорбции: 1 г/л ПДМАЭМА в 10 мМ ТРИС, время адсорбции 40 мин. Изображения получены с высушенных образцов. Размеры сканов 3 × 3 мкм

струкций ПГЭ/ $MnO_2$ /ПДМАЭМА/ХО от рН, при котором происходит нанесение ПДМАЭМА. В то же время сравнение изображений полимерных пленок, полученных в результате адсорбции полностью незаряженного (депротонированного) ПДМАЭМА ( $\alpha = 0$  при рН 9) при температуре 25 °С ( $T < T_{II}$ , рис. 6, Б) и 50 °С ( $T > T_{II}$ , рис. 6, В), свидетельствует о близкой к 100% степени заполнения поверхности ВОПГ как при комнатной, так и при повышенной температуре. Этим можно объяснить отсутствие значительных различий количества ХО, связываемой полимерными пленками, и отсутствие заметного влияния температуры, при которой происходит их формирование, на амперометрические отклики биосенсорных конструкций ПГЭ/ $MnO_2$ /ПДМАЭМА/ХО (рис. 4, Б). Отметим, что неконтролируемая агрегация макромолекул ПДМАЭМА в водных растворах при  $T > T_{II}$  заметно осложняет процесс формирования равномерного полимерного покрытия. Это находит свое выражение в большом разбросе величин биосенсорных откликов полимер-ферментных пленок в том случае, когда ПДМАЭМА наносят при повышенной температуре (рис. 4, Б).

Полученные в настоящей работе результаты, отражающие влияние рН адсорбции ПДМАЭМА на электрохимические отклики сенсорных покрытий, хорошо согласуются с полученными ранее данными для полимер-ферментных конструкций на основе амфифильных диблок-сополимеров, содержащих в своем составе ПДМАЭМА в качестве ионогенного блока [4, 5]. В то же время отсутствие или слабое влияние температуры адсорбции ПДМАЭМА на электрохимические отклики рассмотренных выше сенсорных покрытий существенно отличает их от других исследованных нами ранее полимер-ферментных конструкций. В частности, амперометрические отклики микрогель-ферментных пленок значительно увеличиваются с повышением температуры, при которой происходит формирование покрытий из частиц рН- и термочувствительного полимерного микрогеля [7–10].

### Заключение

Итак, полученные результаты убедительно свидетельствуют о том, что рН и температура являются факторами, которые могут оказывать существенное влияние на адсорбцию линейного

стимулчувствительного полимера ПДМАЭМА на графитовых поверхностях. Это влияние обусловлено прежде всего изменением его гидрофильно-гидрофобного баланса при изменении степени заряженности и гидратации, происходящими при варьировании рН и температуры водных растворов данного полимера, и находит свое отражение в способности ПДМАЭМА формировать однородные и гладкие пленки на подобных поверхностях. Мы полагаем, что последующая иммобилизация фермента ХО происходит эффективно только там, где на исходной графитовой поверхности удается сформировать однородный слой полимера. При этом относительно тонкая пленка ПДМАЭМА после ее перевода в протонированное состояние способна связывать значительные количества фермента, что, вероятно, объясняется высокой плотностью заряда данного полимера, обеспечивающей прочное многоточечное связывание с ним противоположно заряженных биомолекул. Таким образом, применение ПДМАЭМА в качестве составного компонента полимер-ферментного покрытия является, без сомнения, целесообразным и весьма перспективным для формирования биосенсорных систем.

Следует отметить, что на настоящий момент варьирование рН водного раствора ПДМАЭМА в целях улучшения его адсорбции представляется более удобным подходом для модификации графитовых поверхностей, чем изменение температуры. Это обусловлено тем, что температурный фазовый переход этого полимера в незаряженном (депротонированном) состоянии происходит очень быстро в узком температурном интервале. Нагрев водных растворов ПДМАЭМА выше  $T_{II}$  вызывает неконтролируемую агрегацию его макромолекул, что заметно ухудшает воспроизводимость формирования полимерных, а следовательно, и полимер-ферментных покрытий. Вместе с тем потенциал термочувствительности ПДМАЭМА, на наш взгляд, далеко не полностью исчерпан. Так, температура может стать не менее эффективным фактором улучшения адсорбции данного полимера на графитовых поверхностях при значениях рН, соответствующих относительно небольшим степеням протонирования ПДМАЭМА, при которых его фазовый переход в водных средах наблюдается в существенно более широком температурном интервале. Мы полагаем, что это позволит получать однородные тонкие (наноразмерные), но при этом высокоемкие поли-

мерные покрытия для последующего электростатического связывания глобул ферментов, что и будет представлять собой предмет нашего дальнейшего исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Госрегистрационных тем «Молекулярный дизайн, структурно-функциональный анализ и регуляция ферментных систем, клеточных конструкций, бионаноматериалов: фундаментальные основы и приложения в технологии, медицине, охране окружаю-

щей среды» (2021–2023 гг.), номер ЦИТИС: АААА-А21-121011290089-4 и «Современные проблемы химии и физико-химии высокомолекулярных соединений» (2021–2023 гг.), номер ЦИТИС: АААА-А21-121011990022-4.

При выполнении работы было использовано оборудование, закупленное по Программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

Конфликта интересов нет.

Дополнительных материалов нет.

Дополнительной информации нет.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mello L.D., Kubota L.T. // *Food Chemistry*. 2002. Vol. 77. N 2. P. 237.
2. Lvov Y., Decher G., Möhwald H. // *Langmuir*. 1993. Vol. 9. N 2. P. 481.
3. Hammond P.T., Whitesides G.H. // *Macromolecules*. 1995. Vol. 28. N 22. P. 7569.
4. Sigolaeva L.V., Pergushov D.V., Synatschke C.V., Wolf A., Dewald I., Kurochkin I.N., Fery A., Müller A.H.E. // *Soft Matter*. 2013. Vol. 9. N 10. P. 2858.
5. Sigolaeva L.V., Günther U., Pergushov D.V., Gladyr S.Yu., Kurochkin I.N., Schacher F.H. // *Macromol. Biosci*. 2014. Vol. 14. N 7. P. 1039.
6. Gromova M.S., Sigolaeva L.V., Fastovets M.A., Evtushenko E.G., Babin I.A., Pergushov D.V., Amitonov S.V., Eremenko A.V., Kurochkin I.N. // *Soft Matter*. 2011. Vol. 7. N 16. P. 7404.
7. Sigolaeva L.V., Gladyr S.Yu., Gelissen A.P.H., Mergel O., Pergushov D.V., Kurochkin I.N., Plamper F.A., Richtering W. // *Biomacromolecules*. 2014. Vol. 15. N 10. P. 3735.
8. Sigolaeva L.V., Mergel O., Evtushenko E.G., Gladyr S.Yu., Gelissen A.P.H., Pergushov D.V., Kurochkin I.N., Plamper F.A., Richtering W. // *Langmuir*. 2015. Vol. 31. N 47. P. 13029.
9. Sigolaeva L.V., Gladyr S.Yu., Mergel O., Gelissen A.P.H., Noyong M., Simon U., Pergushov D.V., Kurochkin I.N., Plamper F.A., Richtering W. // *Anal. Chem*. 2017. Vol. 89. N 11. P. 6091.
10. Sigolaeva L.V., Pergushov D.V., Oelmann M., Schwarz S., Brugnoli M., Kurochkin I.N., Plamper F.A., Fery A., Richtering W. // *Polymers*. 2018. Vol. 10. N 7. P. 791.
11. Pergushov D.V., Sigolaeva L.V., Balabushevich N.G., Sharifullin T.Z., Noyong M., Richtering W. // *Polymer*. 2021. Vol. 213. P. 123227.
12. Serpe M.J., Yarmey K.A., Nolan C.M., Lyon L.A. // *Biomacromolecules*. 2005. Vol. 6. N 1. P. 408.
13. Hoare T., Pelton R. // *Langmuir*. 2008. Vol. 24. N 3. P. 1005.
14. Wiese S., Spiess A.C., Richtering W. // *Angew. Chem. Int. Ed*. 2012. Vol. 52. N 2. P. 576.
15. Еремеев Н.Л., Сиголаева Л.В., Казанская Н.Ф. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 1992. Т. 33. № 5. С. 511.
16. Synatschke C.V., Schallon A., Jérôme V., Freitag R., Müller A.H.E. // *Biomacromolecules*. 2011. Vol. 12. N 12. P. 4247.
17. Rinkenauer A.C., Schallon A., Günther U., Wagner M., Betthausen E., Schubert U.S., Schacher F.H. // *ACS Nano*. 2013. Vol. 17. N 11. P. 9621.
18. Raup A., Wang H., Synatschke C.V., Jérôme V., Agarwal S., Pergushov D.V., Müller A.H.E., Freitag R. // *Biomacromolecules*. 2017. Vol. 18. N 3. P. 808.
19. Plamper F.A., Ballauff M., Müller A.H.E. // *J. Am. Chem. Soc*. 2007. Vol. 129. N 47. P. 14538.
20. Plamper F.A., Ruppel M., Schmalz A., Borisov O., Ballauff M., Müller A.H.E. // *Macromolecules*. 2007. Vol. 40. N 23. P. 8361.
21. Makhaeva G.F., Rudakova E.V., Sigolaeva L.V., Kurochkin I.N., Richardson R.J. // *J. Appl. Toxicol*. 2016. Vol. 36. N 11. P. 1468.
22. Shumyantseva V.V., Sigolaeva L.V., Agafonova L.E., Bulko T.V., Pergushov D.V., Schacher F.H., Archakov A.I. // *J. Mater. Chem. B*. 2015. Vol. 3. N 27. P. 5467.
23. Sigolaeva L.V., Bulko T.V., Konyakhina A.Yu., Kuzikov A.V., Masamrekh R.A., Max J.B., Köhler M., Schacher F.H., Pergushov D.V., Shumyantseva V.V. // *Polymers*. 2020. Vol. 12. N 7. P. 1514.
24. Schallon A., Synatschke C.V., Pergushov D.V., Jérôme V., Müller A.H.E., Freitag R. // *Langmuir*. 2011. Vol. 27. N 19. P. 12042.

Поступила в редакцию 11.03.2021

Получена после доработки 14.03.2021

Принята к публикации 20.03.2021

## ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR BASED ON NANOSIZED POLYMER-ENZYME FILMS COMPOSED OF LINEAR POLY(*N,N*-DIMETHYLAMINOETHYL METHACRYLATE) AND CHOLINE OXIDASE

L.V. Sigolaeva<sup>1\*</sup>, A.Yu. Konyakhina<sup>1</sup>, D.V. Pergushov<sup>2</sup>, I.N. Kurochkin<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>*Division of Chemical Enzymology, Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University;* <sup>2</sup>*Division of Polymer Science, Department of Chemistry, M.V. Lomonosov Moscow State University;* <sup>3</sup>*N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences; \*e-mail: lsigolaeva@belozersky.msu.ru*)

Nanosized polymer-enzyme films were fabricated on graphite surfaces via a sequential two-stage adsorption of the pH- and thermoresponsive polymer, viz., linear poly(*N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate) (PDMAEMA), and the enzyme, viz., choline oxidase (ChO). The influence of the conditions (pH and temperature), which are applied for deposition of the polymer onto graphite surface, on electrochemical responses of the polymer-enzyme sensor constructs and kinetic parameters of enzymatic oxidation of choline by ChO integrated into the polymer-enzyme films was revealed. Stimuli-sensitivity of PDMAEMA was found to control properties of the formed polymer coatings (surface coverage, film thickness and roughness), which decisively determine the amount of the ChO bound by the polymer film and, consequently, the resultant electrochemical characteristics of the polymer-enzyme sensor constructs.

**Key words:** stimuli-sensitivity; thermoresponsive polymer; polyelectrolyte; surface modification; adsorption; thin films; biosensor; poly(*N,N*-dimethylaminoethyl methacrylate); choline oxidase; electrochemistry; atomic force microscopy.

**Сведения об авторах:** *Сиголаева Лариса Викторовна* – ст. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (lsigolaeva@belozersky.msu.ru); *Коняхина Аполлинария Юрьевна* – студентка кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (konyakhina@list.ru); *Пергушов Дмитрий Владимирович* – вед. науч. сотр. кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (pergush@belozersky.msu.ru); *Курочкин Илья Николаевич* – проф., зав. лабораторией постгеномной химии кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, Директор института биохимической физики имени Н.М. Эмануэля, докт. хим. наук (INKurochkin@gmail.com, ikur@belozersky.msu.ru).