

06;07

Адсорбция молекул гемоглобина в пористом кремнии

© *Е.В. Бескровная, В.В. Болотов, Н.А. Давлеткильдеев,
В.Е. Кан, Е.Ю. Мосур, Ю.А. Стенькин*

Омский филиал Института физики полупроводников им. А.В. Ржанова
СО РАН

E-mail: mosur@obisp.oscsbras.ru

Поступило в Редакцию 27 июля 2009 г.

Обнаружено закрепление молекул гемоглобина в порах и на поверхности пористого кремния, что подтверждено с помощью методов атомно-силовой микроскопии и ИК-Фурье-спектроскопии.

Гемоглобин (Hb) способен связывать кислород (O_2), моноокись углерода (CO) и азота (NO), что приводит к изменению электрических и магнитных свойств молекулы гемоглобина [1]. Данные изменения могут быть использованы для детектирования вышеперечисленных веществ, т.е. на основе гемоглобина может быть разработан биосенсор. Имобилизация ферментов на поверхности твердого носителя является одним из важнейших процессов при создании биосенсоров. Использование пористого кремния (por-Si) в качестве носителя обусловлено возможностью варьирования его структурных характеристик (величина удельной поверхности, диаметр и объем пор) в широких пределах, а также чувствительностью его электронных свойств к молекулярному окружению [2]. В настоящее время распространена ковалентная имобилизация биомолекул на поверхности пористого кремния, включающая сложную многостадийную функционализацию поверхности por-Si [3,4]. В то же время отмечается, что при определенных условиях биомолекулы могут проникать в поры кремния [5]. Поэтому целью настоящей работы является имобилизация гемоглобина на поверхности пористого кремния без предварительной функционализации por-Si.

В работе использовалась цельная гепаринизированная кровь, которая была подвергнута центрифугированию (Cole-Palmer P-17307-05). Выделенные эритроциты трижды отмывались в 0.9%-м изотоническом

растворе хлорида натрия (NaCl). Гемолиз эритроцитов осуществлялся добавлением равного объема дистиллированной воды, для очищения полученного раствора использовался хлороформ. После процедуры отмывания отделялась надосадочная жидкость (раствор гемоглобина). Раствор оксигемоглобина (OxyHb) получен при насыщении гемоглобина кислородом, раствор метгемоглобина (MetHb) — при добавлении раствора феррицианида калия ($K_3Fe(CN)_6$).

Пленки пористого кремния были получены методом анодного травления пластины монокристаллического кремния (КДБ-0.005) *p*-типа ориентации (111) в растворе HF (42%): C_3H_7OH при плотности тока 75 mA/cm^2 .

Экспозиция образцов пористого кремния в водных растворах гемоглобина проводилась в течение двух часов. Затем образцы тщательно промывались в дистиллированной воде и высушивались.

Исследование поверхности образцов осуществлялось с помощью атомно-силового микроскопа (АСМ) „Solver Pro“ (NT-MDT) в полуконтактном режиме сканирования на воздухе с использованием зондового датчика NSG01. ИК-спектры пропускания пористого кремния были измерены с помощью ИК-Фурье-спектрометра Bruker Vertex 70.

На рис. 1 представлены АСМ-изображения поверхности пленки пористого кремния до и после экспозиции в растворе гемоглобина. Высота и диаметр молекул (с учетом уширения зондом микроскопа), находящихся на поверхности пористого кремния, согласуются с известными литературными данными для молекулы гемоглобина. Средняя поверхностная плотность молекул гемоглобина на изображенном образце составила $1.75 \cdot 10^8\text{ cm}^{-2}$. Полученные изображения подтверждают иммобилизацию гемоглобина на поверхности пористого кремния.

Были измерены ИК-спектры пропускания пленок пористого кремния до и после иммобилизации производных гемоглобина. Полученные спектры приведены на рис. 2. Гемоглобин обнаруживает характерную для белков полосу при 3300 cm^{-1} . Поглощение в этой области обусловлено валентными колебаниями групп C–H и N–H. Имеются также полосы в области $1700\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$. Вблизи 1650 cm^{-1} наблюдается полоса поглощения, специфичная для группы C=O. В данную полосу поглощения вносят вклад и колебания ионизированной карбоксильной группы COO^- . Полоса вблизи 1550 cm^{-1} приписывается валентным колебаниям групп C–N, N–H. Вышеуказанные особенности ИК-спектров производных гемоглобина соответствуют известным литературным дан-

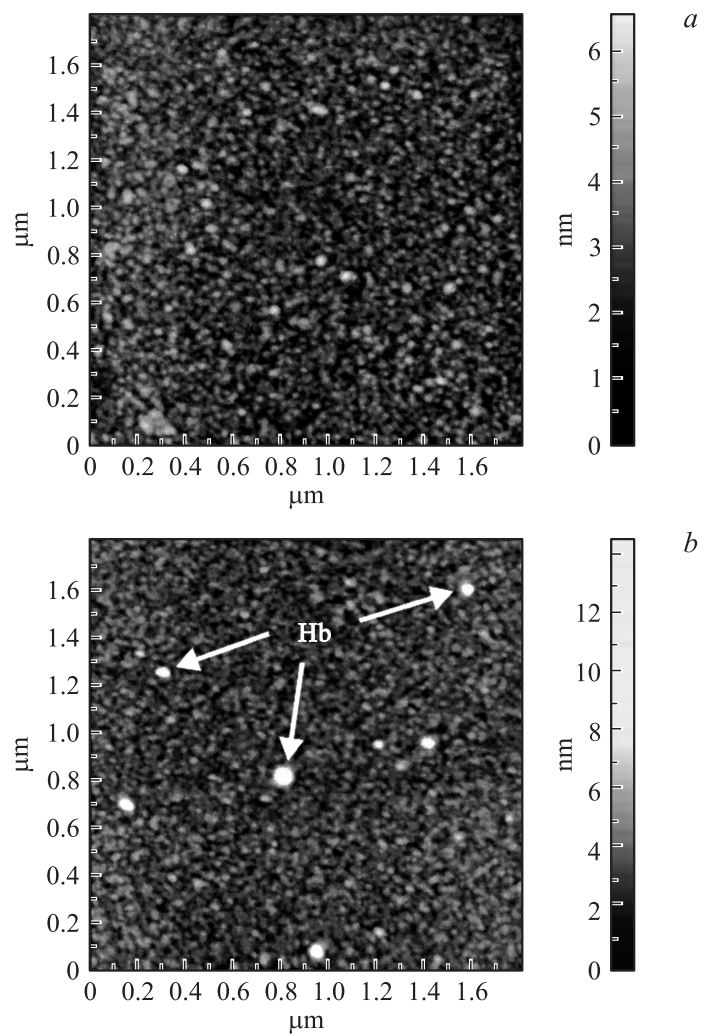


Рис. 1. АСМ-изображения поверхности пленки пористого кремния до (a) и после иммобилизации гемоглобина (b).

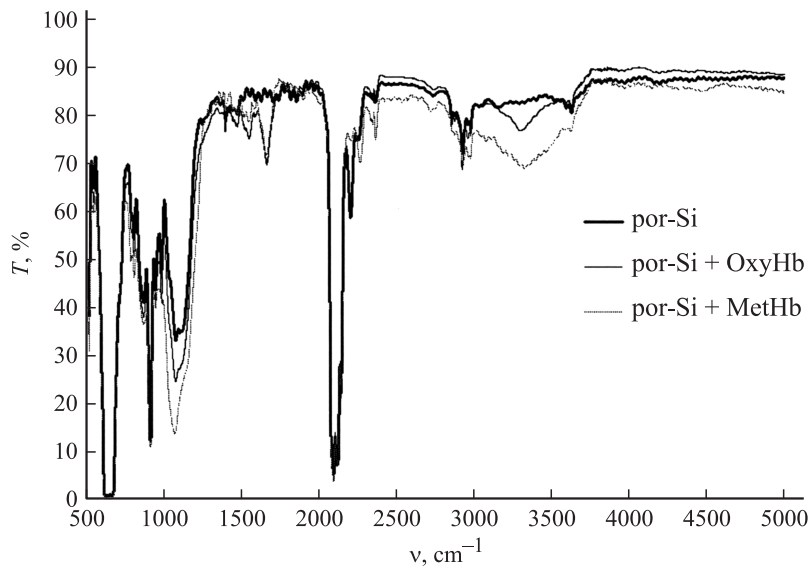


Рис. 2. ИК-спектры пропускания пористого кремния, оксигемоглобина и метгемоглобина, иммобилизованных на пористом кремнии.

ным [6]. Приведенные данные ИК-спектроскопии также свидетельствуют о закреплении гемоглобина на поверхности por-Si.

При анализе дифференциальных ИК-спектров пропускания производных гемоглобина (оксигемоглобина и метгемоглобина) обнаружены значимые различия. Выявленные полосы при 1160, 1120 и 1050 см⁻¹ можно отнести к деформационным колебаниям связанной группы OH⁻. Данный факт приобретает особое значение, если учесть, что шестым лигандом в метгемоглобине является гидроксильная группа.

Закрепление Hb на поверхности por-Si, по-видимому, объясняется проникновением молекул гемоглобина в поры кремния. В работе [5] с помощью спектральной эллипсометрии показано, что молекулы сывороточного альбумина способны проникать в поры кремния. Учитывая то, что молекула сывороточного альбумина имеет сходство с молекулой Hb (глобулярная структура, близкие молярные массы) и то, что размеры пор используемого в работе кремния больше диаметра молекулы

гемоглобина, можно предполагать подобный механизм адсорбции гемоглобина в пористом кремнии.

Таким образом, обнаружено закрепление гемоглобина на поверхности пористого кремния. Имобилизация подтверждена с помощью методов АСМ и ИК-Фурье-спектроскопии. Показано, что пористый кремний может использоваться в качестве носителя для исследования ИК-спектров гемоглобина и его производных.

Список литературы

- [1] *Ghosh A.* The Smallest Biomolecules: Diatomics and their Interactions with Heme Proteins. Elsevier. 2008. 614 p.
- [2] *Зайцев В.Б., Плотников Г.С., Рябчиков Ю.В.* // Вестник Московского университета. Серия 3. Физика, астрономия. 2004. № 5. С. 29–31.
- [3] *Letant S.E., Hart B.R., Kane S.R., Hadi M.Z., Shields S.J., Reynolds J.G.* // Advanced Materials. 2004. V. 16. N 8. P. 689–693.
- [4] *Xia B., Li J., Xiao S.-J., Guo D.-J., Wang J., Pan Y., You X.-Z.* // Chemistry Letters. 2005. V. 34. N 2. P. 226.
- [5] *Arwin H., Gavutis M., Gustafsson J., Schultzber M., Zangoie S., Tengvall P.* // Phys. Stat. Sol. (A). 2000. V. 182. N 1. P. 515–520.
- [6] *Kuenstner J.T., Norris K., Kalasinsky V.F.* // Biospectroscopy. 1997. V. 3. N 3. P. 225–232.