

# ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ УГЛЕРОДНЫХ НАНОМАТЕРИАЛОВ Н-БЕНЗИЛОКСИКАРБОНИЛГЛИЦИНОМ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ СОЗДАНИЯ БИОСЕНСОРОВ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ, ИММУНОАНАЛИЗА И АНАЛИЗА ДРУГИХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Горшков М. В.

*Самарский университет*

## Аннотация

В данной работе исследован метод изготовления биосенсоров на основе углеродных нанотрубок (УНТ). В основе работы лежит метод получения аминок групп на поверхности УНТ при помощи фермента Н-бензилоксикарбонилглицина (Z-Gly-OH) с последующим присоединением иммуноглобулинов различными методами. Функционализация УНТ при помощи Z-Gly-OH относится к реакциям 1,3-диполярного циклоприсоединения. Преимущество данного метода заключается в том, что в процессе функционализации не разрушается кристаллическая решётка УНТ, и как следствие сохраняется проводимость нанотрубок. Данное свойство играет решающую роль в процессе детектирования измеряемого вещества, поскольку УНТ в данном процессе выступает в качестве трансдьюсера преобразующего химическую реакцию в электрический сигнал, который можно измерить. Получение аминок групп на поверхности УНТ открывает возможность ковалентной иммобилизации ферментов, иммуноглобулинов, аптамеров и других органических молекул, что в свою очередь открывает широкий спектр детектирования анализируемых веществ, имеющих ценность для определения патологического состояния организма человека или состояния окружающей среды.

Ключевые слова: *углеродные нанотрубки, антиген, иммуноглобулин, ковалентная функционализация, биосенсор*

## Введение

В настоящее время большое количество методов серодиагностики активно применяется в работе медицинских учреждений и эпидемиологических служб. Всех их объединяет одно – точность, простота и доступность. В то же время для этих методов характерна высокая цена и длительность проведения диагностической процедуры. В связи с этим продолжают разрабатываться методики, позволяющие проводить диагностику за меньший промежуток времени и по гораздо меньшей себестоимости. Одним из таких направлений является разработка электрохимических сенсоров, способных регистрировать сигнал при минимальных концентрациях антигена в исследуемом растворе. К таким сенсорам относятся, например, сенсоры на основе углеродных нанотрубок или графена [1, 2].

УНТ впервые были обнаружены в 1952 году. В статье советских учёных Радушкевича и Лукьяновича [3] во время термического разложения оксида углерода были получены и описаны волокна диаметром 100 нм. Более подробное описание в 1991 году в своей работе привел С. Ииджима, в которой сделал фотографию УНТ в просвечивающий электронный микроскоп и подробно описал их свойства [4]. УНТ представляют собой цилиндрические структуры, имеют вид длинных трубок толщиной в один атом. Могут иметь от одного до нескольких слоев и являются аллотропной формой углерода, кристаллическая решетка которой представлена углеродными атомами, находящимися в состоянии  $sp^2$  гибридизации

и которые образуют друг с другом ковалентные связи, пространственно напоминающие ячейку имеющую вид гексагона. Углерод в таком состоянии имеет один неспаренный электрон, который в данном случае выступает в качестве носителя тока и как следствие обуславливает проводящие свойства нанотрубок.

Графен был открыт чуть ранее, в 1859 году Бенжамин Броули в своем эксперименте сумел получить раствор оксида графена [5]. Спустя почти 100 лет в 1948 году Дж. Руесс и Ф. Фогт измерили толщину оксида графена и смогли экспериментально подтвердить существование еще одной аллотропной формы углерода [6]. Как было видно из эксперимента, графен представлял собой двухмерный кристалл, углерод в котором, также, как и в УНТ находился в состоянии  $sp^2$  гибридизации, и как в УНТ образовывал друг с другом гексагональную кристаллическую решетку, где неспаренные электроны углерода свободно перемещались по поверхности двухмерного кристалла.

Благодаря своей проводимости УНТ и графен нашли широкое применение в изготовлении электрохимических сенсоров на их основе [2]. Кроме того, УНТ или графен в таких сенсорах выступает не только в качестве трансдьюсера, но и в качестве подложки, на которую можно иммобилизовать различными методами молекулы способные реагировать с анализируемым веществом. Благодаря неспаренному электрону атома углерода в толще кристаллической решетки и на местах её дефектов, углерод способен образовывать от одной до трех ковалентных связей, что в свою очередь, позволяет разветвлять углеродный скелет УНТ и получать на их поверхности различные функциональные группы, меняя тем самым химические свойства УНТ [7]. Этот процесс называется функционализацией.

Существует несколько методов функционализации УНТ, которые, в общем, можно разделить на ковалентную и не ковалентную функционализацию [8]. Не ковалентная функционализация – метод, при котором на поверхности УНТ или графена осаждаются атомы, ионы или целые молекулы без образования ковалентной или ионной связи. Силы, которые удерживают молекулы на поверхности УНТ называются ван-дер-ваальсовыми. Ковалентная функционализация, как уже было описано ранее, является результатом взаимодействия валентного углерода с другими атомами, результатом которого является образование одинарной, двойной или тройной ковалентной связи.

Для целей создания биосенсоров преимущественно используют ковалентную функционализацию, т. к. процесс подготовки биосенсора предполагает отмычку не присоединённых к подложке белковых молекул во избежание паразитных сигналов. Также, для белков с маленькой молекулярной массой исключается вероятность смывки с подложки. Кроме того, ковалентно связанные антитела значительно стабильнее, например после 1 часа при 56 °С количество иммуноглобулинов G остается практически неизменным, в отличие пассивной адсорбции, где остается только 50 - 70% от всего объема частиц. Также ковалентно связанный белок позволяет создавать достаточно жесткие условия для уменьшения неспецифического взаимодействия с другими белками.

В литературе из описанных методов наибольшей популярностью пользуются методы 1,3 – диполярного циклоприсоединения [9]. Данный метод, несмотря на всю сложность выполнения является наиболее предпочтительным, т. к. иные способы ковалентной функционализации УНТ или графена предполагают частичное разрушение кристаллической решетки, чтобы таким образом повысить валентность углерода [10], так как углерод находящийся на концах обладает значительно большей реакционной способностью, чем углерод находящийся в толще кристаллической решётки. Однако,

большое количество дефектов может сильно снизить проводимость УНТ и сделать молекулу нестабильной.

Метод циклоприсоединения объединяет в себя несколько методов, некоторые из которых успешно применяют для функционализации УНТ, многие из которых хорошо описаны в литературе [11]. Это реакции с присоединением азомициновых илидов, реакции с нитрилами, реакция Бингеля и др.

Реакция Прато или реакция 1,3-диполярного присоединения азометиновых илидов известна давно и представляет собой метод, при котором аминокислоты или пептиды в присутствии формальдегида образуют илид (рис 1), который реагирует с двойной связью УНТ с образованием функциональной группы [12].

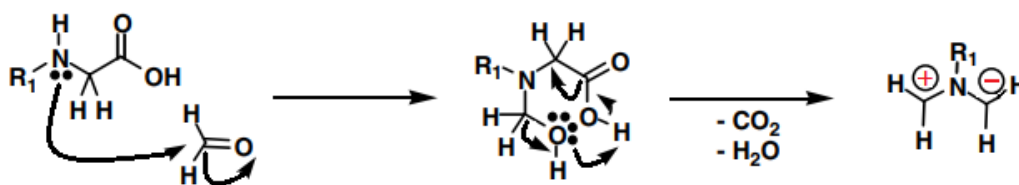


Рис 1. Образование илида

В зависимости от используемой аминокислоты на поверхности УНТ образуется аминокислота. Например, при использовании производной аминокислоты Н-бензилоксикарбонилглицина (Z-Gly-OH) образуется третичный амин, в котором радикал представлен в виде бензилоксикарбонильного остатка (Рис 2. А.). При нагревании можно добиться удаления радикала и тогда вместо третичного амина образуется вторичный амин (Рис 2. В.) [13].

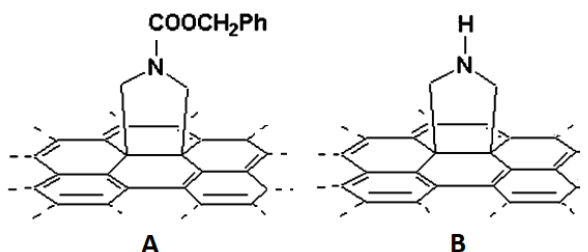


Рис 2. А. Бензилоксикарбонильный остаток; В. Вторичный амин

Как ранее уже упоминалось существует множество методов 1,3 – диполярного циклоприсоединения. Ряд авторов в своих работах изменяли условия проведения реакции Прато для получения наилучших условий функционализации: сокращение времени реакции, повышение числа образуемых на поверхности функциональных групп, а также уменьшение побочных продуктов реакции [14]. В реакции УНТ с Н-бензилоксикарбонилглицином также применяется метод сухой функционализации, при которой все продукты реакции находятся в твердом агрегатном состоянии и реагируют друг с другом в момент повышения температуры [13]. По мнению авторов, такой метод функционализации УНТ позволяет добиться наибольшего образования функциональных групп на поверхности УНТ. Кроме этого данный метод позволяет контролировать процент аминокислот, формируемых на поверхности кристаллической решетки. Например, при функционализации Н-бензилоксикарбонилглицином при температуре 180 С° на поверхности УНТ будут преимущественно образовываться группы, представленные бензилоксикарбонильным остатком. Однако, при повышении температуры до 250 С° защитная группа отщепляется и на поверхности остается только аминокислота [13].

В данной работе предложен концептуальный метод изготовления биосенсоров на основе УНТ и графена. Для получения аминогрупп была использована известная реакция функционализации УНТ с N-бензилоксикарбонилглицином [13]. Полученные таким образом аминогруппы позволяют увеличить дисперсность углеродного материала, а также провести иммобилизацию иммуноглобулинов или любых других пептидов известным способом. Технически, иммобилизация антител возможна как непосредственно на электроде, при нанесении раствора антител на зону гребёнок чипа (Рис 3. А), так и в растворе УНТ, с последующим осаждением подготовленного комплекса УНТ-антитело на чип (Рис 3. В.).

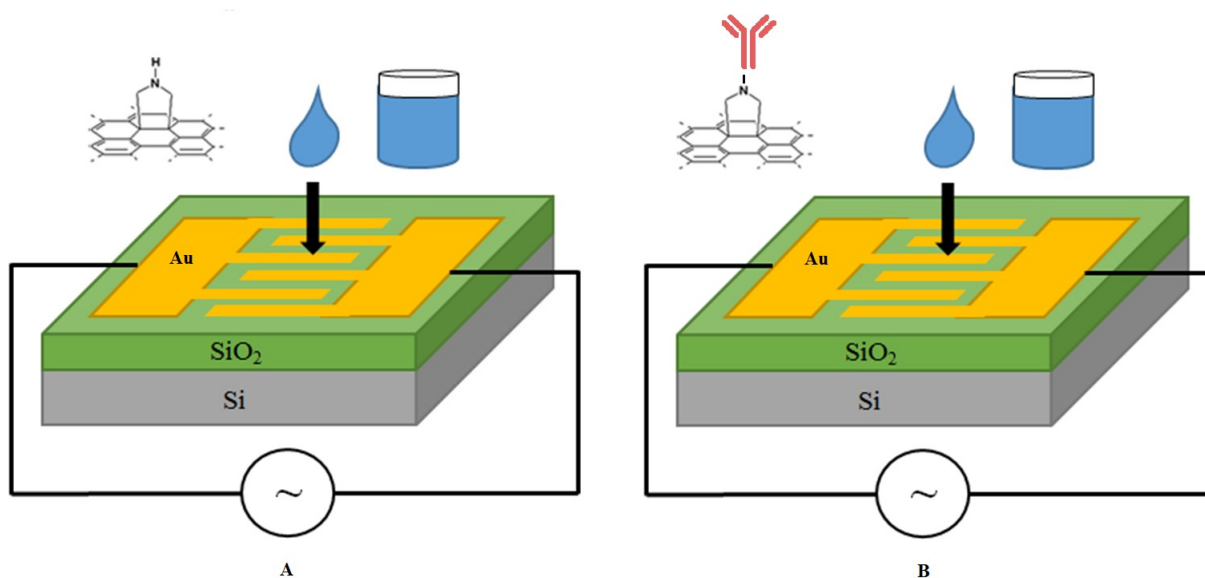


Рис 3. А. Осаждение УНТ-NH с последующей иммобилизацией на чипе; В. Осаждение комплекса УНТ-антитело на чипе

В работах многих авторов оба метода иммобилизации успешно применялись для изготовления биосенсоров [15, 16, 17]. Выбор метода иммобилизации зависит от конструктивной особенности биосенсора и метода измерения сигнала. В данной работе были использованы оба метода иммобилизации для проведения сравнительного анализа двух разных концептуальных моделей.

### Экспериментальная часть

1. 30 мг параформальдегида (98%, Loba Chemie Pvt. Ltd) было предварительно растерто в агатовой ступке. Полученный гомогенный порошок растворяли в этаноле. Затем в полученный раствор были добавлены 5 мг одностенных углеродных нанотрубок (95%, Timesnano длиной от 5 до 30 мкм) и 5 мг сухого N-бензилоксикарбонилглицина (98%, Alfa Aesar). Полученную смесь нагревали при  $230\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течении 3 часов. Затем полученную смесь промывали деионизованной водой и фильтровали.

2. Был подготовлен раствор антител. В пробирке растворили 500 мкл бычьего сывороточного альбумина (БСА) в 500 мкл раствора 0.1 М фосфатного буфера.

3а. В отдельную пробирку были добавлены 5 мг функционализированных УНТ, 50 мкл деионизованной воды, 250 мкл раствора 0.1 М фосфатного буфера (pH 7.4) и 500 мкл раствор 50% глутарового альдегида. Полученную смесь тщательно перемешали. Далее пробирку инкубировали при комнатной температуре в течении 3 часов при постоянном

перемешивании. При помощи центрифугирования УНТ усаждали на дне пробирки и тщательно удаляли супернатант. Далее УНТ промывали в растворе 0.25 М фосфатного буфера трижды с последовательным удалением супернатанта из пробирки. Далее добавляли в пробирку 250 мкл деионизованной воды и 250 мкл раствора 0.1 М фосфатного буфера. Затем добавляли в пробирку раствор подготовленного БСА для иммобилизации на УНТ. В течении 2 часов инкубировали пробирку при комнатной температуре при постоянном перемешивании. Далее функционализированные антителами УНТ осаждали методом диэлектрофореза на специально подготовленных электродах.

3б. Функционализированные Н-бензилоксикарбонилглицином УНТ были методом диэлектрофореза осаждены на золотые электроды. Затем на ранее подготовленный раствор антител был капельно нанесен на зону осажденных УНТ. Сенсор с иммобилизованными антителами выдерживали в течении 1 часа, при постоянном измерении тока. Как только ток достигнет максимального значения промываем электрод раствором 0.1 М фосфатного буфера для удаления несвязанных антител.

### Результаты

В результате эксперимента были получены УНТ функционализированные с Н-бензилоксикарбонилглицином. Одним из показательных характеристик УНТ является дисперсность. Сами по себе УНТ проявляют выражено гидрофобные свойства и очень плохо растворяются в полярных растворителях образуя выраженные агломераты друг с другом, которые можно разделить только ультразвуком очень высокой мощности. Для сравнительного анализа на дисперсность были взяты два водных раствора чистых и функционализированных УНТ. В пробирке №1 представлены УНТ функционализированные Н-бензилоксикарбонилглицином, в пробирке №2 – образцы чистых УНТ. Оба раствора были продиспергированы в ультразвуковой ванне с частотой 35 КГц и мощностью 55 Вт. На изображении видно, что в пробирке № 2 растворенные УНТ образуют более выраженные агломераты, чем в пробирке №1. Это может свидетельствовать об образовании на поверхности аминогрупп, которые проявляют в воде гидрофильные свойства.



Рис 4. 1). Раствор функционализированных УНТ; 2). Раствор чистых УНТ

Далее образцы функционализированных Н-бензилоксикарбонилглицином УНТ были проанализированы на ИК – спектрометре.

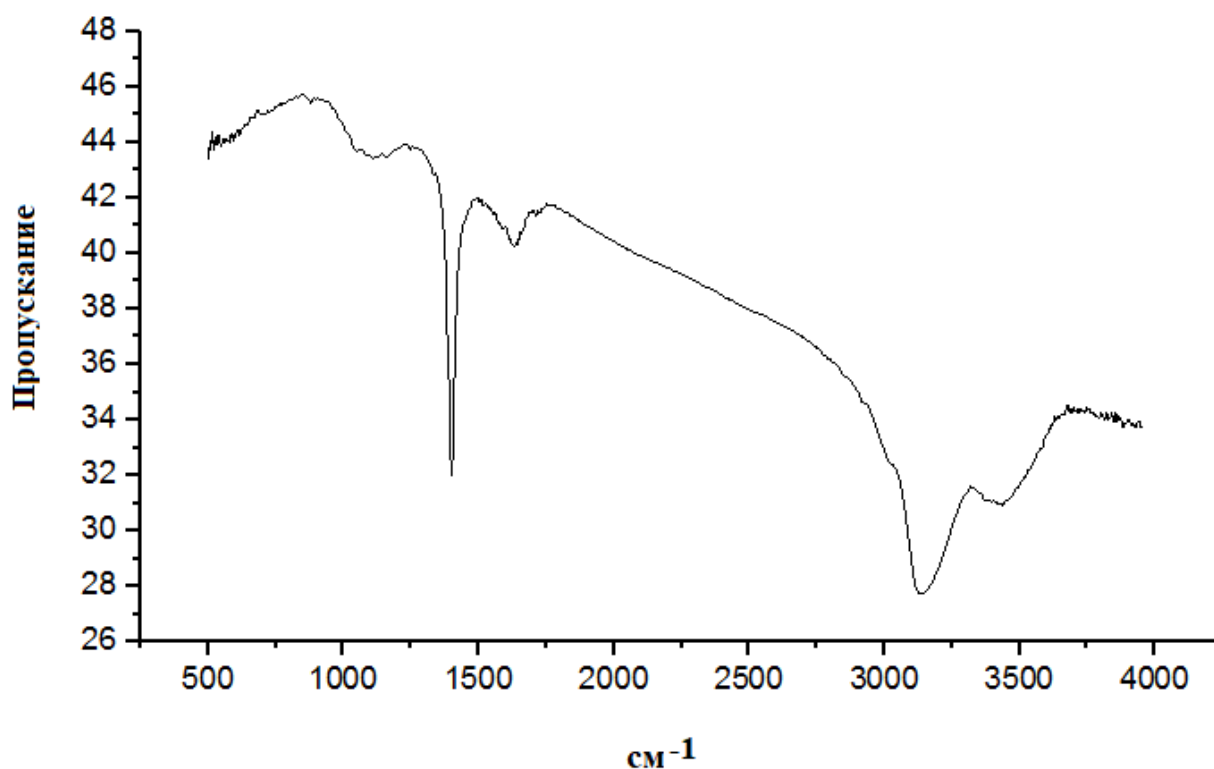


Рис 5. ИК-спектр функционализированных УНТ

В зоне  $3300 - 3500 \text{ см}^{-1}$  видна зона валентных колебаний первичных и вторичных амидов, что соответствует группам  $-\text{NH}_2$  и  $-\text{NH}$ . Деформационные колебания амидов проявляют себя в районе  $1400 \text{ см}^{-1}$ , что согласуется с теоретическим данными.

После выполнения процесса иммобилизации антител на УНТ тоговый раствор изменил цвет, а на дне пробирки периодически образуется осадок, которые после встряхивания образует достаточно стабильную взвесь (Рис 6).



Рис 6. Раствор иммобилизованных антител на УНТ.

Подготовленные таким образом комплекс УНТ-антитело можно хранить при температуре от  $2$  до  $10 \text{ C}^0$  достаточно длительный период. Такого объема примерно хватает на 100 рабочих сенсоров.





Рис 7. Фотография позолоченных электродов, сделанная на сканирующем электронном микроскопе

Рабочий электрод имеет расстояние между гребенками 10 мкм (Рис 7). Для работы достаточно капли объемом 2 мкл, которая наносится в зону гребенок электрода. Нанесенные УНТ под действием электрического поля в процессе диэлектрофореза выстраиваются между гребенками чипа и замыкают его. Такая конструкция проста в изготовлении и по себестоимости значительно превосходит аналоги.

### **Заключение**

Была выполнена функционализация УНТ методом 1,3 – диполярного циклоприсоединения с использованием Н-бензилоксикарбонилглицина. Проведена успешная ковалентная иммобилизация иммуноглобулина известным методом в растворе УНТ. Полученный раствор комплекса УНТ-антитело был успешно осажден методом диэлектрофореза на подготовленных электродах. Также была выполнена иммобилизация раствора иммуноглобулинов на электроды с ранее осажденными функционализированными УНТ методом диэлектрофореза.

### **Список используемой литературы**

1. Usman Yaqoob and Mohammad I. Younis, «Chemical Gas Sensors: Recent Developments, Challenges, and the Potential of Machine Learning—A Review», *Sensors* 2021, 21, 2877.
2. Surajit Kumar Hazra and Sukumar Basu, «Graphene-Oxide Nano Composites for Chemical Sensor Applications», *C — Journal of Carbon Research*, 2016, 2(2), 12
3. Л. В. Радущкевич и В. М. Лукьянович., «О структуре углерода, образующегося при термическом разложении окиси углерода на железном контакте». - *ЖФХ*, 26, 88 (1952)
4. S. Iijima, «Helical microtubules of graphitic carbon», *Nature* 354 56 (1991)
5. Brodie, B. C., «On the Atomic Weight of Graphite», *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 149: 249–259.
6. Ruess G.; Vogt F., «Höchstlamellarer Kohlenstoff aus Graphitoxhydroxyd», *Monatshefte für Chemie (in German)*, 78 (3–4): 222–242.
7. King Sun Siu, «Development of Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes for siRNA Delivery», *Electronic Thesis and Dissertation Repository*, 2006.

8. Mareen Gläske, «Tailoring the Optoelectronic Properties of Carbon Nanotubes - A Comparative Study of Covalent and Non-Covalent Functionalization Approaches», Dissertation, August 2018
9. M. Maggini, G. Scorrano, M. Prato, «Addition of Azomethine Ylides to C60: Synthesis, Characterization, and Functionalization of Fullerene Pyrrolidines», *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 115, pp. 9798-9799, October 1993
10. Т. П. Дьячкова, А. Г. Ткачев, «Методы функционализации и модифицирования углеродных нанотрубок». – М.: Издательский дом «Спектр», 2013. – 152 с.
11. Indresh Kumar, Sravendra Rana and Jae Whan Cho, «Cycloaddition Reactions: A Controlled Approach for Carbon Nanotube Functionalization», *Chem. Eur. J.* 2011, 17, 11092 – 11101
12. R. Araújo, F. M. Fernandes, M. F. Proença, C. J. R. Silva, and M. C. Paiva, «The 1,3-Dipolar Cycloaddition Reaction in the Functionalization of Carbon Nanofibers», *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol.7, pp. 3441–3445, November 2007
13. M. Conceicao Paiva, F. Simon, R. M. Novais, T. Ferreira, M. F. Proenca and W. Xu, «Controlled Functionalization of Carbon Nanotubes by a solvent-free Multicomponent Approach», *acsNANO*, vol. 4, pp. 7379–7386, November 2010
14. R. F. Araújo, M. C. Paiva, M. F. Proenca, C. J. R. Silva, «Functionalization of Carbon Nanofibers by 1,3 - Dipolar Cycloaddition Reactions and Its Effect on Composite Properties», *Compos. Sci. Technol*, vol. 67, pp. 806-810, January 2006
15. Jithesh V. Veetil, Kaiming Ye, «Development of Immunosensors Using Carbon Nanotubes», *biotechnology progress*, Volume 23, Issue 3, 2007, P. 517-531
16. Tatianny A. Freitas, Alessandra B. Mattos, «Amino-Functionalization of Carbon Nanotubes by Using a Factorial Design: Human Cardiac Troponin T Immunosensing Application», *BioMed Research International* Volume 2014, Article ID 929786, 9 pages
17. Qin Wei, Kexia Mao, Dan Wu, «A novel label-free electrochemical immunosensor based on graphene and thionine nanocomposite», *Sensors and Actuators B: Chemical*, Volume 149, Issue 1, 6 August 2010, Pages 314-318