

НАНОСТРУКТУРНЫЕ БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ КОМПОНЕНТОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МЕМБРАН

© 2021 г. О.Д. Новикова*, Г.А. Набережных*, А.А. Сергеев**

*Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,
690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159

**Институт автоматики и процессов управления ДВО РАН 690041, Владивосток, ул. Радио, 5
E-mail: novolga_05@mail.ru

Поступила в редакцию 26.11.2020 г.

После доработки 22.04.2021 г.

Принята к публикации 26.04.2021 г.

Белковые молекулы обладают уникальным свойством передачи материала и/или информации через непроницаемый барьер, которым является липидный бислой. Эта своеобразная роль клеточных «привратников» особенно интересна для целей нанобиотехнологии, поскольку мембранные белки могут с успехом использоваться для связи между двумя различными средами, разделенными липидным бислоем. В настоящем обзоре описаны структурные особенности и свойства трансмембранных белков как наиболее перспективных компонентов современных биосенсорных устройств. Приведены также методы формирования липидных бислоев, прикрепленных к твердой поверхности, и способы получения жесткой белковой «арматуры», которые позволяют реконструировать и сохранять используемые белки в функционально активной конформации по отношению к широкому спектру определяемых аналитов. Высокая селективность и специфичность белковых молекул в распознавании рецепторов или лигандов делает их незаменимыми для биомедицинского анализа и молекулярной диагностики.

Ключевые слова: наноструктурные биосенсоры, трансмембранные белки, липидный бислой.

DOI: 10.31857/S0006302921040062

Авторы многих обзоров, затрагивающих самые различные аспекты формирования, свойств и применения наноструктурных материалов, всего лишь десятилетие назад считали, что нанотехнологии находятся в начальной стадии развития, поскольку основные открытия, предсказанные в этой области, еще не были сделаны [1, 2]. Однако исследования, проводимые в последние несколько лет, уже дали практические результаты. В настоящее время достижения передовых научных разработок в области нанотехнологий успешно применяются к решению задач медицины, фармацевтической промышленности и военной отрасли, что позволяет отнести их к новым и прогрессивным технологиям современности и самым наукоемким отраслям промышленности [3–7].

Согласно общепринятым определениям к нанотехнологиям относят области науки и техники, которые заняты конструированием, характеристикой, производством и применением структур, приборов и систем, свойства которых определяются их формой и размером на нанометровом уровне. Наиболее интересные эффекты возникают при переходе наночастиц в квантово-размерное состояние, когда величина их радиуса стано-

вится меньше 20 нм. При таких размерах происходит существенное изменение физико-химических свойств исходного «объемного» соединения (bulk material), что отражается на обусловленном поведением электронов свойствах материала, в первую очередь оптических, магнитных и электрических [8]. Благодаря такому размерно-зависимому проявлению физических свойств и их нетипичности по сравнению со свойствами атомов, с одной стороны, и макроскопических тел, с другой стороны, наночастицы выделяют в отдельную, промежуточную область и нередко называют «искусственными атомами».

С точки зрения биосенсорики наибольший интерес представляет еще одна отличительная черта наночастиц от объемного материала — значительная доля атомов на поверхности частицы по отношению к объему. Нетрудно посчитать, что при среднем размере атома, равном 0.1 нм (1 ангстрем), у частицы размером 10 нм больше половины атомов от их общего числа будет находиться на поверхности. Это приводит к существенной зависимости физико-химических свойств наночастицы от состояния ее поверхности, что обу-

словливает широкие возможности для создания сенсорных систем различного рода.

Использование белковых структур для создания биосенсоров несет в себе значительные перспективы широкого применения подобных наноконструкций в жизнедеятельности человека, что подтверждается все возрастающим количеством работ в данной области [9–12]. В настоящее время этот класс природных биополимеров наиболее изучен, по этой причине многие исследователи при конструировании биоматриц нанометрового размера отдают предпочтение работе с белками. При создании нанокompозитных биосенсоров типа «неорганическое ядро/органическая оболочка» на основе белковых молекул наиболее распространенным способом функционализации поверхности наночастиц (неорганического ядра) является использование тиольных и карбоксильных групп белка [13]. С одной стороны, это обеспечивает долговременную стабильность частиц, препятствуя их агрегации, а с другой — позволяет повысить совместимость неорганических частиц с живыми тканями и в перспективе получать *in vivo* биосенсоры для экспресс-анализа крови и других биологических жидкостей. Данные исследования очень актуальны, поскольку проблема совместимости разрабатываемых биосенсоров с живыми организмами до сих пор не решена [14] и большинство биосенсоров типа «неорганическое ядро/органическая оболочка» так и остаются на стадии исследований *in vitro*. В этой связи в настоящее время ведется активный поиск новых типов архитектур биосенсоров, обладающих всеми достоинствами *in vitro* сенсоров, но позволяющих проводить измерения непосредственно в живых системах [15]. В частности, в литературе имеются данные о применении квантовых точек в качестве новых флуоресцентных наноматериалов для биомедицинского зондирования и визуализации [14, 15]. По мнению авторов данного обзора, наиболее перспективным кандидатом для создания сенсорных систем такого рода является один из основных компонентов бактериальных мембран, а именно трансмембранные белки. Чтобы определить активность такого белка в определенных условиях, его нужно интегрировать в искусственные липидные бислои, иммобилизованные на твердой поверхности. Это достигается применением методов структурирования поверхностей в микро- и нанометровом масштабе, химической модификации и анализа, формирования липидного бислоя, экспрессии белков, очистки их и солюбилизации и, что наиболее важно, интеграции белка в сконструированные липидные бислои. Таким образом, изготовление биосенсоров требует комплексного подхода, основанного на знаниях в области материаловедения, поверхностной и аналитической химии, молекулярной биологии и биотехнологии.

БЕЛКИ И ЛИПИДЫ – КОНСТРУКТИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ БИОСЕНСОРОВ

Мембранные белки – перспективные кандидаты для создания биологических нанопор. Белки представляют собой широко распространенный в природе класс высокомолекулярных органических соединений. Они состоят из альфа-аминокислот, соединенных в полипептидную цепь пептидной связью. Эффективность бионанотехнологических разработок на основе белков обусловлена уникальными свойствами этих природных биополимеров, которые способны к самому сложному из известных самопроизвольному фолдингу, могут точно распознавать огромный круг мишеней и взаимодействовать с ними и, наконец, имеют широкий диапазон собственной каталитической активности [16]. Начало новой эры в инженерии мембранных белков произошло благодаря детальному изучению их структуры, лучшему пониманию молекулярных механизмов трансмембранной диффузии, методическим и техническим достижениям в области рефолдинга мембранных белков, а также применению усовершенствованных вычислительных подходов, разработанных для растворимых белков [17]. Решающим фактором в этом процессе стало получение кристаллов различных мембранных белков и расшифровка их атомной структуры, что позволило определить в деталях механизмы передачи сигналов через биологические мембраны.

Исследования биологических мембран дали новый скачок в развитии технологий получения искусственных мембран или, другими словами, нанопор из природных биополимеров. В настоящее время при создании биологических нанопор внимание исследователей в значительной степени сосредоточено на порообразующих токсинах и белках наружной мембраны бактерий, поскольку они имеют прочную β -баррельную структуру, что делает их удобным объектом для нанотехнологии. Белки этого класса, так называемые порины, имеют обширные неполярные взаимодействия с гидрофобным ядром бислоя благодаря тому, что значительная доля их полипептидной цепи погружена в липидный бислой (как минимум, один трансмембранный домен). Они выполняют широкий спектр важных биологических функций, включая специфический и неспецифический транспорт растворенных веществ и ионов (насосы, транспортеры и каналы), выработку энергии (АТФ-синтазы), передачу сигнала (рецепторы), осмотическую регуляцию (порины), мембрано-связанные биохимические процессы (киназы, протеазы). Многие из этих функций включают передачу материала и/или информации через непроницаемый барьер, которым является липидный бислой. Эта уникальная роль клеточных «привратников» особенно интересна для целей

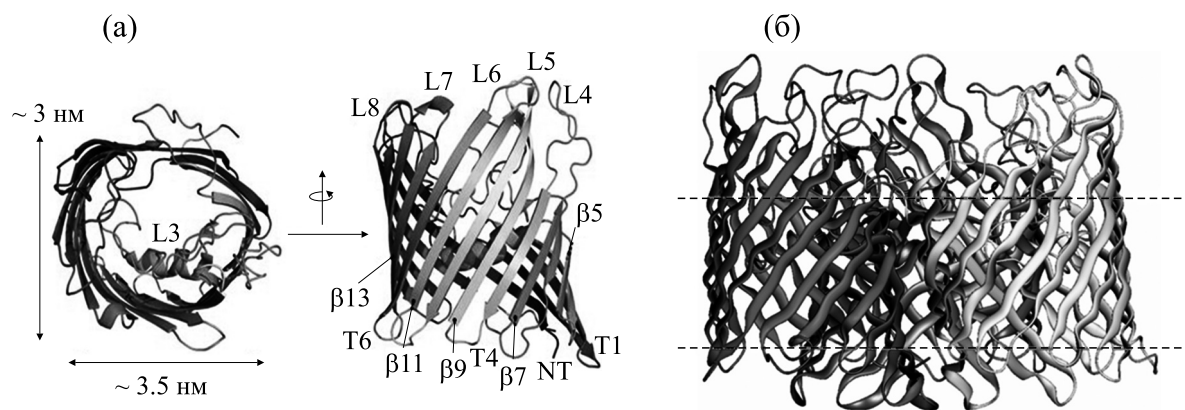


Рис. 1. Пространственная структура OmpF порина *Y. pseudotuberculosis* в виде ленточной диаграммы ([21], с изменениями). (а) — Мономер порина (вид сверху и вид сбоку); β -стрэнды представлены в виде лент; линиями, соединяющими β -стрэнды показаны внешние петли и изгибы. (б) — Тример порина; двумя параллельными линиями ограничена трансмембранная область барреля.

нанобиотехнологии, поскольку мембранные белки могут с успехом использоваться для связи между двумя различными средами, разделенными липидным бислоем [18].

Особое место среди перспективных кандидатов для конструирования биологических нанопор занимают каналы неспецифических порообразующих белков наружной мембраны грамотрицательных бактерий, обеспечивающих транспорт низкомолекулярных веществ через бактериальную мембрану [19]. Порины принадлежат к β -баррельным интегральным мембранным белкам, образующим в нативной мембране олигомерные структуры (чаще всего тримеры). Они состоят из антипараллельных амфифильных β -стрэндов (тяжей), гидрофобные остатки аминокислот которых экспонированы в липидный бислой, а гидрофильные — во внутреннюю часть барреля [20]. Ранее методом гомологичного моделирования нами были построены теоретические модели мономера и тримера OmpF порина из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* (рис. 1). Кристаллическая структура PhoE порина из *Escherichia coli* была использована в качестве матрицы [21].

Амфифильная природа молекул поринов позволяет им легко встраиваться в липидный бислой [22]. В присутствии фосфолипидов порины в результате белок-белкового взаимодействия могут самопроизвольно формировать наноструктуры [23]. Выбор детергента и липида имеет большое значение для получения двумерных кристаллов порообразующих белков, при этом химическая структура указанных компонентов определяет параметры упорядоченных белковых структур [24–26]. Нанопоры на основе белков ионных каналов представляют собой новую альтернативу современным аналитическим устройствам [27, 28]. Они могут регулировать поток ионов с помо-

щью различных стробирующих механизмов, представляющих собой переключение между закрытым и открытым состоянием поры в ответ на специфические стимулы, такие как связывание лиганда (ионные каналы, управляемые лигандом), изменение трансмембранного напряжения (управляемые напряжением ионные каналы) или механическая сила (механозависимые ионные каналы). Использование нанопор в биомедицинской молекулярной диагностике предпочтительно из-за их высокой селективности и специфичности белковой молекулы в распознавании рецептора-лиганда. Кроме того, одним из основных преимуществ использования белковых нанопор является знание их точной структуры при атомном разрешении, что предполагает возможность внедрения функциональных групп на стратегических позициях внутри канала.

Технологический потенциал многих мембранных белков можно исследовать только *in vitro*. Это требует высокой концентрации белков, что предполагает получение их при сверхэкспрессии в виде рекомбинантных белков в *E. coli* с использованием векторных плазмид и последующую очистку (например, путем введения гистиониновой метки и использования никель-аффинной хроматографии). Кроме того, учитывая достаточно высокую степень гидрофобности интегральных мембранных белков, для предотвращения их неспецифической агрегации при извлечении из мембраны требуется использование детергентов. Как правило, экспрессия рекомбинантного белка приводит к образованию нерастворимых агрегатов (телец включения) в цитоплазме, где интересующий белок в «правильной» конформации содержится в виде отдельной фракции, небольшой по содержанию. Все эти трудности обычно приводят к низкому выходу целевого белка. Далее, чтобы определить активность

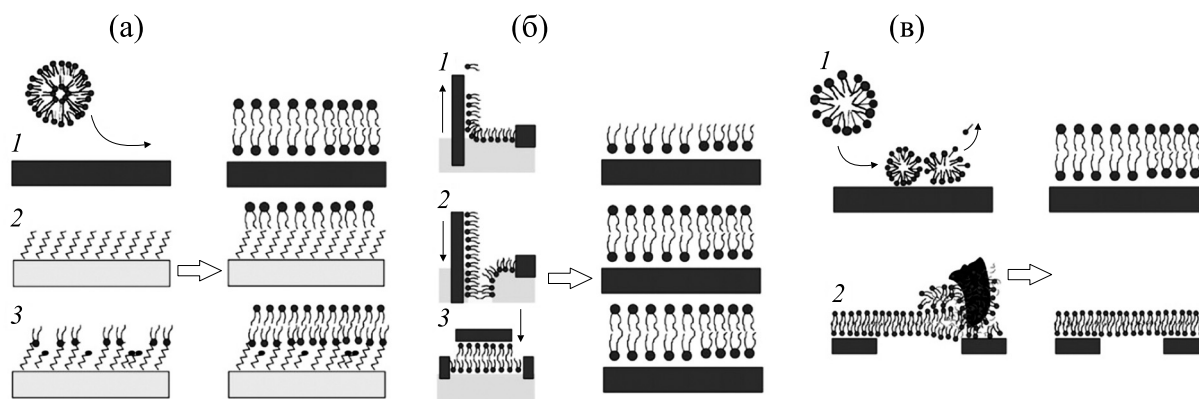


Рис. 2. Методы, используемые для сборки липидных мембран на твердых носителях: (а) — слияние везикул (1–3); (б) — метод Ленгмюра–Блоджетт (1–3); (в) — наслаивание липидов из растворов или из смешанных мицелл липидов с детергентами (1, 2) [38], с изменениями).

полученного белка при заданных условиях, он должен быть интегрирован в искусственные липидные бислои, в том числе иммобилизованные на твердых носителях. Известно, что в протеолипосомах многие мембранные белки достаточно стабильны и их функциональная активность может быть надежно зафиксирована [29]. Например, активность белка-транспортера при микроскопических исследованиях может быть определена путем измерения поглощения окрашенного транспортируемого вещества (аналита) с помощью спектрометра [30] путем количественного определения переносимого в протеолипосомы красителя [31] или с помощью электрохимических измерений [32]. Обнаружение аналита с помощью электрохимических методов может быть осуществлено относительно просто и с высокой чувствительностью, а электроды могут быть легко интегрированы в датчик устройства. Однако разработка практических методик приготовления планарных липидных бислоев на поверхности остается сложной научно-исследовательской задачей даже после более чем двадцати лет исследований [33]. Для конструирования нанопор необходимы техники структурирования поверхности в микро- и нанометровом масштабе, надежные способы формирования липидного бислоя и интеграции в них белков, а при необходимости химическая модификация встроенных белковых молекул [33].

Значение липидной составляющей биосенсоров. Закрепленные бислои. Липидные бислои являются природными барьерами для биологических клеток и клеточных компартментов. При этом окружающая среда существенно влияет на пространственную структуру и функцию многих трансмембранных белков. Именно это свойство мембран необходимо учитывать при разработке биосенсоров, систем доставки лекарств и наноконтейнеров. В результате многочисленных исследований химические и физические свойства

природных фосфолипидных бислоев были оптимизированы для изучения функциональных свойств интегральных белков. Однако подобные мембраны часто неприменимы в технических процессах из-за их высокой текучести и отсутствия долговременной стабильности [34]. Закрепление липидов посредством ковалентной или квазиковалентной связи кажется привлекательным решением проблемы иммобилизации мембраны, однако поддержание латеральной подвижности и достаточного расстояния между твердой подложкой и поверхностью, обращенной к мембране, желательно, если не существенно для функционирования липидного бислоя как матрицы для реконструкции белков. Разрешение этого кажущегося противоречия — одна из ключевых задач при изготовлении мембран.

Предпосылкой для правильного функционирования биосенсоров на основе мембранных белков является формирование прикрепленных к подложке липидных бислоев, которые позволяют реконструировать используемые белки в функционально активной конформации [35]. В зависимости от выбранных липидов и поддерживающих поверхностей плоские липидные бислои на твердых субстратах могут быть получены самыми разнообразными способами и на различных наноструктурированных поверхностях [36]. На рис. 2 схематически показаны различные подходы к формированию липидных бислоев, закрепленных на твердых носителях: образование бислоя может быть достигнуто с помощью хемосорбции, самосборки, метода Ленгмюра–Блоджетт [37].

При самосборке посредством слияния (рис. 2а) однослойные липидные везикулы разрываются при контакте с поверхностью и образуют поддерживаемую липидную мембрану, покрывающую поверхность раздела. На некоторых гидрофильных субстратах (например, оксиде или нитриде кремния) образование плоских бислоев

происходит самопроизвольно в результате слияния везикул. На гидрофобных поверхностях (например, предварительно сформированных тиол-алкильных монослоях) вместо бислоев из липидных везикул образуются липидные монослои. Технология Ленгмюра–Блоджетт (рис. 2б) заключается в переносе сформированного на водной поверхности мономолекулярного слоя амфифильного вещества или мультимолекулярных пленок на твердую подложку. Липидный монослой удерживается при определенном натяжении на границе раздела фаз, что обеспечивает плотность упаковки липидов. При формировании плоского липидного бислоя из смешанных мицелл липид-детергент (рис. 2в, 1) липидный материал перемещается из водного раствора на твердую поверхность раздела. С помощью диализа детергент постепенно удаляется из мицелл, что приводит к разрушению мицелл и образованию бислоя на границе раздела фаз. При образовании бислоя на границе раздела «субстрат–водный раствор» растворенные в органическом растворителе липиды добавляют к поверхности, находящейся в водной фазе. Амфифильные липиды выравниваются на границе раздела фаз, а затем при испарении растворителя сливаются, образуя бислой (рис. 2в, 2).

В качестве твердых субстратов, поддерживающих липидный бислой, используются различные материалы. Вполне эффективными для этих целей оказались такие носители, как слюда, стекло, полупроводники и диэлектрики (например, оксиды индия, олова или кремния), а также различные металлические поверхности (золото или платина). Следует учитывать, что свойства твердой подложки определяют стратегию формирования бислоев. На практике изготовление бислоев с помощью метода Ленгмюра–Блоджетт проще, а методы самосборки более универсальны [37].

В работе [39] было впервые показано, что адсорбция и распределение везикул на стекле позволяют получать плоские липидные бислои, сохраняющие латеральную подвижность липидов, и формировать иммобилизованные планарные липидные бислои на полимерной основе, образованной 1,2-димиристоил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтанол-аминполиэтиленгликольтриэтоксисилом [40]. Для получения положительно заряженных бислоев были успешно использованы полимеры на основе производных целлюлозы, нанесенные на поверхность полупроводникового материала, оксида индия-олова (indium tin oxide), функционализированного октадецилтрихлорсиланом [41].

Очевидно, что для применения электрохимических методов необходима электропроводность используемой твердой поверхности. Исследования, проведенные различными научными группами по паттернизации и применению так назы-

ваемых поддерживаемых планарных липидных бислоев (s-BLM) на различных металлических поверхностях, таких как платина, золото или серебро, показали, что золото идеально подходит для формирования высокоориентированных липидных бислоев [42–45].

Прикрепленные (поддерживаемые) мембраны, сформированные на золотых поверхностях, могут быть классифицированы в соответствии с их архитектурой: гибридные бислои, состоящие из липидного монослоя на гидрофобной подложке и второго слоя поверх него (1); липидные бислои на гидрофильной или заряженной поверхности (2); ковалентно заякоренные липидные бислои на гидрофильной поверхности (3).

Помимо золота еще одной часто используемой поверхностью является кремний, так как этот материал совместим с большинством преобразователей поверхности в биосенсорных устройствах. Так, описана подготовка поверхности оксида кремния с помощью модификации декстраном (слой порядка 100 нм), которая может служить основой для нанесения бислоя комбинацией двух методов — ковалентной связи с термически окисленной поверхностью оксида кремния путем эпексидирования или аminosиланизации [46].

Для получения биомиметических мембран, обеспечивающих естественную биологическую среду для интегрированных в них мембранных белков, разрабатываются и такие подходы, как использование блок-сополимеров [12] или даже полная замена фосфолипидов на амфифильные блочные полимеры. Подобные синтетические мембраны обладают механической прочностью, в десять раз большей, чем фосфолипидные бислои [47].

Примером может служить работа, в которой авторы использовали гибридные мембраны из сополимерных блоков поли(1,4-изопрен-этиленоксид), смешанных с 1,2-дифтитаиноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолином [12]. Встраивая белок OmpF наружной мембраны *E. coli* в эти мембраны, они продемонстрировали, что функциональность этого порина в биомиметических липополимерных мембранах сохраняется независимо от молекулярной массы блок-сополимеров. Таким образом, авторы показали, что смешивание синтетических полимерных мембран с фосфолипидами, независимо от толщины полученной мембраны, позволяет осуществлять реконструкцию трансмембранных белков с сохранением их функции.

Таким образом, синтетические амфифильные липиды и полимеры самоорганизуются в водном растворе либо в плоские мембраны, либо в везикулы. Усовершенствование методов самосборки липидных мембран и включения в них протеинов привели к значительному повышению стабильности мембраны и упаковки белковых молекул,

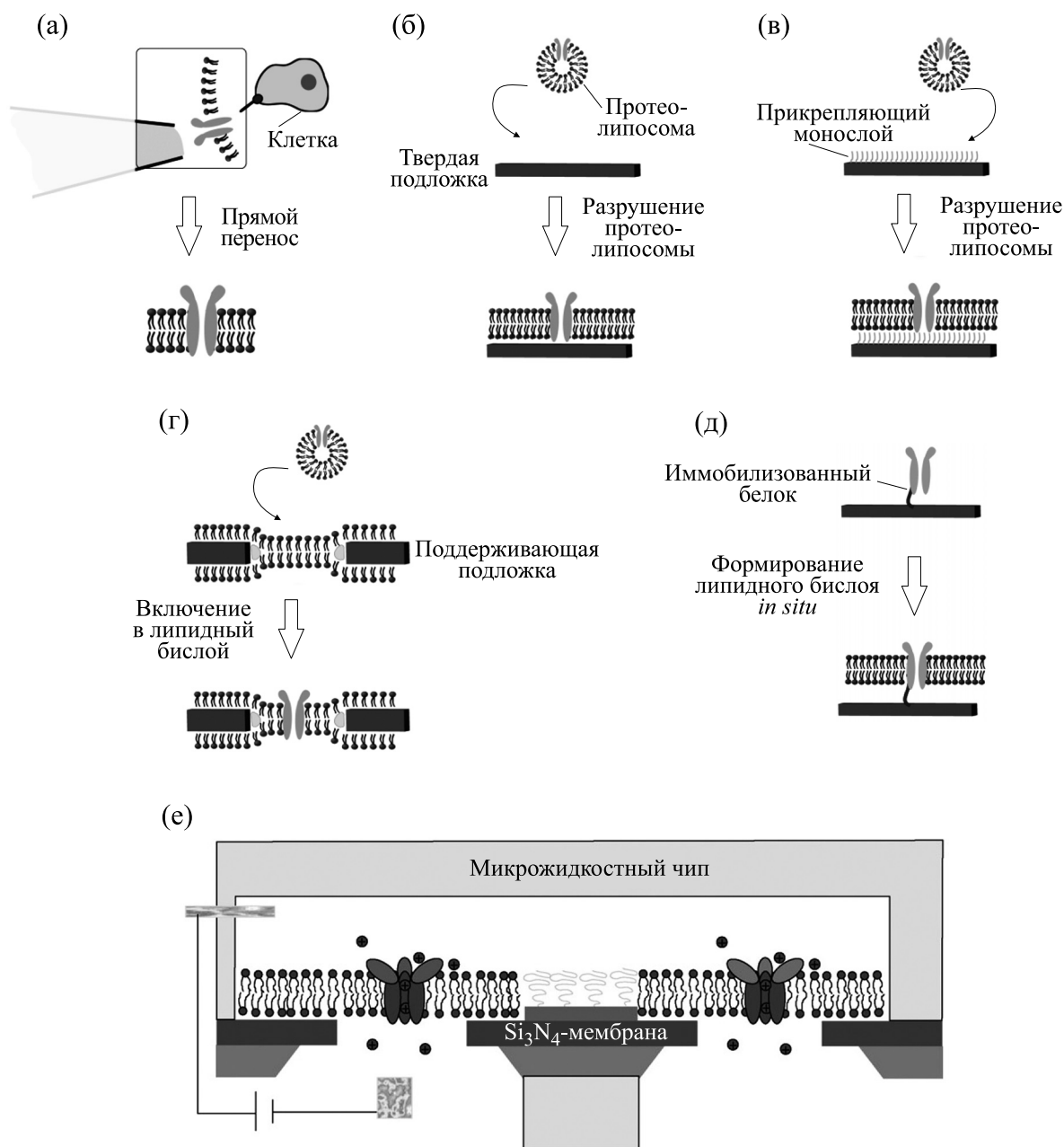


Рис. 3. Методы реконструкции трансмембранных белков в липидные бислои ([33], с изменениями). Описание способов включения исследуемого белка приведено в тексте.

что, соответственно, способствовало улучшению чувствительности измерений. Липидный бислой в виде суспензии (известный также как свободный липидный бислой) разделяет на платформе *цис*- и *транс*-стороны водных растворов электролитов и становится единственным путем для прохождения молекул между двумя водными фазами, разделенными бислоем. Иными словами, двухслойная липидная мембрана образует мост между встроенными белками и компонентами устройства. Поскольку липидный состав определяет не

только свойства мембраны, но и взаимодействие с используемым интегральным белком, для конструирования биосенсора требуются экспериментальные установки с различными липидными композициями [48].

Методы иммобилизации белков. Существуют различные способы интеграции мембранных белков в предварительно сформированный липидный бислой [33] (рис. 3).

Белок можно напрямую вносить в липидный бислой в виде участка клеточной мембраны с по-

мощью стеклянной пипетки с маленьким отверстием (рис. 3а). Во многих экспериментах используются протеолипосомы, содержащие исследуемый белок. При соприкосновении с твердой подложкой протеолипосомы могут разрушаться и «растекаться» на чистых твердых поверхностях (рис. 3б) или на химически модифицированных поверхностях (рис. 3в). Другим вариантом реконструкции белка в виде протеолипосом может быть его включение в предварительно сформированный липидный бислой, перекрывающий пору (рис. 3г). Для ориентированной иммобилизации мембранного белка на поверхности используется His-метка, а на следующем этапе формируется липидный бислой (рис. 3д). Гигантские однослойные везикулы, если они расположены над порой, спонтанно разрываются, в результате чего образуются липидные бислои, закрывающие пору (рис. 3е).

Как следует из вариантов реконструкции белка, представленных на рис. 3, он может быть включен в липидный бислой, сформированный не только на твердой поверхности (рис. 3б, в, д), но и в липидный бислой, покрывающий пору (рис. 3а, г, е). В литературе встречается описание формирования двухслойных липидных мембран на небольших отверстиях (диаметром 60 нм) на высокоупорядоченной подложке из пористого оксида алюминия [49]. После нанесения липидных бислоев реконструкцию и ионопроводящие свойства белка наружной мембраны *E. coli* OmpF контролировали с помощью одноканальных записей. Наблюдали характерные состояния проводимости трех мономеров, быструю кинетику и состояния субпроводимости. Блокировка потока ионов в результате взаимодействия просвета поры с антибиотиком ампициллином указывала на полную функциональность белкового канала в двухслойных мембранах нанометрового масштаба.

Авторы настоящего обзора изучили формирование упорядоченных наноструктур порина OmpF из наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* двумя методами: из протеолипосом и прямой реконструкцией белка в фосфолипидный бислой, предварительно нанесенный на поверхность слюды [50]. Морфологию полученных структур анализировали с помощью атомно-силовой микроскопии. Показано, что эффективность формирования, степень однородности и размер доменов порина существенным образом зависят от условий эксперимента. Обнаружено, что полученные из протеолипосом единичные домены агрегированных молекул порина имели неравномерное распределение в бислое и большой разброс в диаметре (20–100 нм). При прямой реконструкции порина показано, что снижение pH солибилизирующего буфера способствует включению большего количества белка, однако

не приводит к формированию достаточно протяженных участков пориновых наночастиц. Наиболее эффективное встраивание порина в липидный бислой было достигнуто при использовании белка в комплексе с пептидогликаном и липополисахаридом, с которыми порин тесно связан в нативной бактериальной мембране [50].

Несмотря на преимущества белковых наноструктур и успешные примеры их создания, одним из постоянных ограничений является отсутствие методологии для получения жесткой белковой «арматуры», которая сохраняет свою функциональность в широком спектре условий окружающей среды. Это требование может быть выполнено путем регулирования с нанометровой точностью взаимодействия реконструируемых в липидный бислой белков с твердым носителем. Успешным подходом в этом контексте может стать использование структурных мотивов молекулы белка в качестве стабильных каркасов для связывания с подложкой, которые путем подходящих мутаций, делеций, вставок или слияний создают белковые структуры с желаемыми новыми функциями [51, 52].

Существуют три основных типа связывания белков с твердой подложкой:

- физическая адсорбция, основанная на электростатических и гидрофобных взаимодействиях [53, 54];

- ковалентное связывание, примером которого может служить взаимодействие поверхности золота, предварительно обработанного соответствующими реагентами, с сульфгидрильными или аминогруппами белка [55, 56];

- биоспецифическое связывание, например, такого рода, как взаимодействие ДНК-белок или антиген-антитело [57].

Физическая адсорбция белка на твердой поверхности, например за счет электростатических взаимодействий, является весьма привлекательным методом из-за простоты исполнения. Такие взаимодействия обычно обратимы, но вполне надежны.

Иммобилизация белков на нанопористых, толстых (8 мкм) пленках диоксида титана (TiO_2) является чрезвычайно стабильной, что объясняется вторичными процессами связывания, происходящими после начальной иммобилизации [58]. Авторы подробно изучили факторы, влияющие на адсорбцию белка на TiO_2 : исследовали pH среды, ионную силу раствора, поверхностный заряд белка, размер белка и время иммобилизации.

Многообещающей стратегией для образования гибридных биоконъюгатов является связывание белковых молекул, модифицированных полигистидином, с неорганическими нанокристаллами за счет сродства к металлу. Метод очень

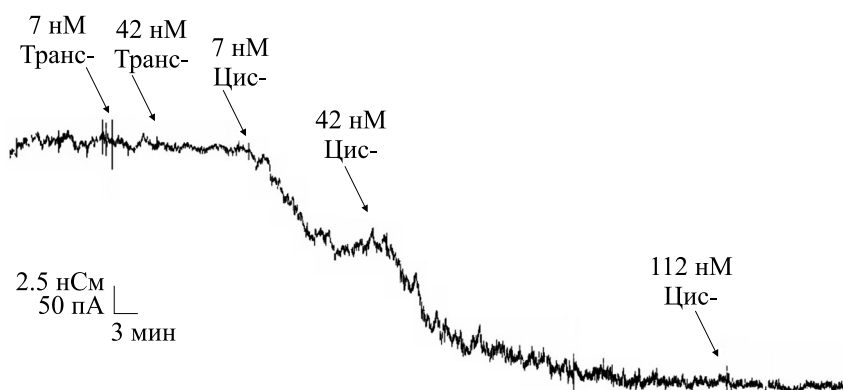


Рис. 4. Типичные записи ионного тока через тримерный трансмембранный белок мальтопорин в присутствии модифицированной мальтодекстрозы ([61], с изменениями).

прост в реализации, поскольку белки и пептиды, меченные полигистидином, обычно получают с использованием хорошо известных методов молекулярной инженерии. В работе [55] сообщается об использовании мутанта OmpF-E183C, в который был введен единственный цистеин на коротком периплазматическом витке. OmpF-E183C связывается непосредственно с золотыми поверхностями и создает белковые слои высокой плотности путем самосборки из раствора детергента. Когда поверхность золота предварительно обрабатывали β -меркаптоэтанолом и добавляли тиолипиды после стадии иммобилизации белка, по данным ИК-спектроскопии он сохранял свою β -структуру. В работе [56] авторы исследовали самосборку двух сконструированных белков — мальтозосвязывающего белка с присоединенным His7 (MBP-His) и флуоресцентного белка mCherry с концевым His6, осуществляемую за счет сродства к металлу, на золотых наночастицах (AuNP). Для тестирования самосборки AuNP-MBP-His7 использовали аффинную гель-хроматографию, в то время как связывание NP-mCherry-His6 оценивали с помощью измерения флуоресценции.

Таким образом, применяя различные методы, разработанные на сегодняшний день, с помощью плоских мембран и везикул можно создать универсальные биосенсорные платформы для ряда инженерных приложений [38, 59, 60].

ПРИМЕРЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КАНАЛООБРАЗУЮЩИХ МЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ В БИОСЕНСОРНЫХ УСТРОЙСТВАХ

В литературе описан целый ряд примеров изучения функциональных свойств и создания биосенсоров на основе различных белков [61–69]. Конкретные изменения конформации мембранного белка, существенные или небольшие, про-

исходящие при взаимодействии с аналитом, фиксируются с помощью электрофизиологических методов как активация, ингибирование или модуляция проводимости канала.

На примере одного из специфических поринов наружной мембраны бактерий *E. coli*, мальтопорина (LamB порин), образующего канал для поглощения мальтодекстрина, изучено его специфическое связывание с бактериофагом лямбда (фаг λ , *Escherichia virus Lambda*) [61]. Для выяснения механизма связывания авторы реконструировали мальтопорин в плоские липидные мембраны и исследовали его чувствительность с помощью внешнего трансмембранного потенциала. Вначале авторы реконструировали около 300 каналов мальтопорина в растворителе, содержащем плоский липидный бислой, и наблюдали стабильную проводимость. Введение гибридного белка MBP-grpJ из бактериального вируса лямбда (в концентрации 7 и 42 нМ) в компартмент, соответствующей внутриклеточной стороне канала, не вызвало никакого эффекта. Однако введение белка с противоположной стороны, соответствующей внеклеточной стороне, вызвало значительное снижение ионной проводимости (рис. 4). Поскольку размеры канала не превышают нескольких ангстрем, молекулярные взаимодействия со стенкой канала отражают связывание субстрата, приводящее к конформационным изменениям белка. С помощью этой модели авторы смогли продемонстрировать асимметрию связывания бактериального фага лямбда с его мальтопориновым рецептором [61].

Обнаружено, что канал неспецифического порина OmpF, предназначенный для пассивной диффузии через наружную мембрану *E. coli*, является основным путем проникновения β -лактамовых антибиотиков. С помощью записи высокого разрешения проводимости тока через мембрану авторам удалось зафиксировать продвижение от-

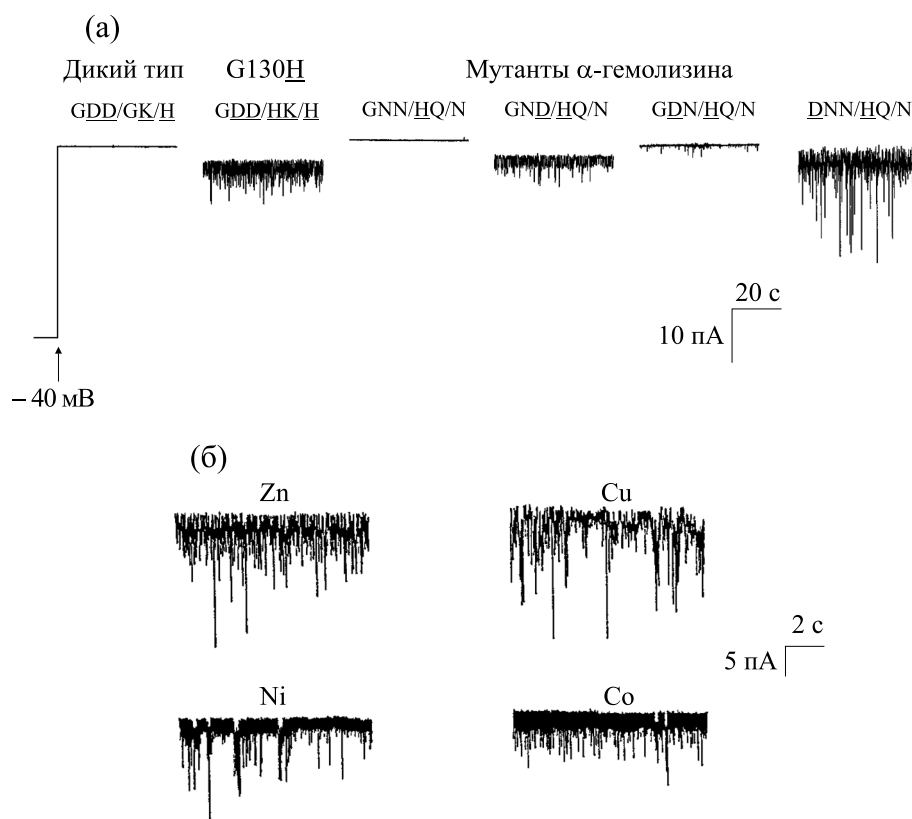


Рис. 5. Записи тока одиночного гетеромерного канала альфа-гемолизина (α HL), содержащего сайт связывания ионов цинка ($Zn(II)$) [64], с изменениями. (а) — Одноканальные записи генно-инженерных мутантов α HL. Концентрация $Zn(II)$ в транс-камере равна 1 мМ. (б) — Флуктуации тока одиночных каналов, образованных мутантом α HL (G130H) в зависимости от типа двухвалентного катиона, добавляемого в транс-камеру.

дельных молекул ампициллина. Анализ распределения зарядов внутри канала и на молекуле ампициллина, выполненный методом молекулярного моделирования, показал, что ампициллин и некоторые другие эффективные пенициллины и цефалоспорины взаимодействуют с аминокислотными остатками в зоне сужения канала OmpF [62].

В работе [63] описано важное свойство транс-мембранного OmpF-пори́на как рецептора антибактериального токсина колицина N и показана принципиальная возможность использования его для обнаружения этого анализита. В этом случае плоский липидный бислой с помощью тиолипидов иммобилизовали на золотой подложке с гидрофильными этиленгликолевыми спейсерами и использовали в качестве электрода, что обеспечивало регистрацию лиганд-стробирующей функции канала OmpF. Связывание домена колицина N, наблюдаемое с помощью поверхностного плазмонного резонанса, индуцировало блокирование канала [63].

Отличительной особенностью применения белковых комплексов в биосенсорике является возможность целевой химической модификации

исходной молекулы (включая ее структурный дизайн). В качестве примера можно привести способ получения гетеромерной формы альфа-гемолизина (α HL), бактериального порообразующего белка стафилококка, в котором одна из семи субъединиц содержит сайт связывания для двухвалентных металлов, $M(II)$ [64]. Чтобы определить, какие остатки составляют сайт связывания иона металла, авторы изучили влияние катионов двухвалентных металлов на одноканальные токи нескольких точечных мутантов по гистидину, изменив количество и расположение ионизируемых боковых цепей в выбранных местах последовательности белка от 126 до 144 остатка. Таким образом, они определили остатки, входящие в состав сайта связывания двухвалентных ионов металла. Ионы $Zn(II)$ в наномолярной концентрации служили прототипом анализита, модулируя проводимость одиночного канала гетеромера в плоской бислойной мембране (рис. 5а). Обнаружено, что флуктуации тока, для одиночных каналов, образованных мутантом α HL G130H, зависят от типа двухвалентного катиона, добавляемого в транс-камеру (рис. 5б). Например, присутствие ионов цинка вызывает множество быстрых бло-

кирующих событий в единицу времени и характерный кинетический паттерн, в отличие от тех, которые вызваны другими двухвалентными катионами (например, Cu(II), Ni(II) или Co(II)) при этой же концентрации. Иными словами, при такой геометрии сенсорной системы каждому иону соответствует характерный сигнал. Благодаря этому свойству одноканальный сенсорный элемент может быть использован для количественного определения более чем одного аналита.

Важным условием прочных нанобелковых конструкций является сохранение функциональной активности составляющих их белков в широком спектре условий обнаружения аналитов. Это необходимо учитывать, поскольку превращение мембранного белка в биомиметическую полимерную матрицу может изменить его функцию. Для сохранения функциональной активности белка, используемого для формирования биоматрицы, применяются различные генно-инженерные подходы. Так, в результате существенной генно-инженерной реконструкции мембранный белок FhuA (который поглощает гидроксамат железа), был преобразован в FhuA Δ C/ Δ 4L, который функционировал как надежный канал для отбора проб, позволяя регистрировать биомолекулярные события [65] (рис. 6). Ключевым моментом в данной разработке стало сочетание методов прямой генной инженерии с подбором условий рефолдинга для создания необычно стабильной белковой нанопоры. Для того чтобы проиллюстрировать это кардинальное изменение в свойствах исследуемого белка, авторы сравнили характерные электрические сигналы, называемые сигнатурами (используемые для выявления особенностей той или иной белковой нанопоры) каналов, образуемых FhuA Δ C/ Δ 4L и стафилококковым α NL при низкой концентрации соли и в сильноокислой среде (при низких значениях pH). Результаты экспериментов свидетельствовали о том, что в отличие от канала, образованного α NL, созданная нанопора белка FhuA Δ C/ Δ 4L сохраняла свое стабильное открытое состояние в течение длительного периода при температуре до 65°C, а ее проводимость при всех исследуемых условиях оставалась неизменной, т.е. блокировка тока отсутствовала [65].

Возможности применения уникальных характеристик канала сконструированного белка FhuA Δ C/ Δ 4L авторы продемонстрировали на примерах детектирования биомолекул на основе белок-белковых и белок-нуклеиновых взаимодействий (рис. 6). В первом примере (рис. 6а, б) показано, что это белковая нанопора функционирует как чувствительный элемент, позволяющий различать похожие полипептиды, состоящие из свернутого домена барназы, РНКазы, состоящей из 110 остатков (Ba), к которому присоединены положительно заряженные неструктурированные

полипептиды (pb2), представляющие собой N-концевую часть pb2-прецитохрома. Указанные полипептиды имели различную длину, но одинаковую плотность электрического заряда.

Во втором примере (рис. 6в-д) показано, что сконструированная нанопора FhuA Δ C/ Δ 4L функционирует как чувствительный элемент для анализа ферментативного расщепления сыровоточного иммуноглобулина (IgG) при очень кислом pH. Активность пепсина по расщеплению IgG контролировали во времени (в оптимизированных условиях 1 М NaCl, 10 мМ фосфат-цитрат, pH 3.9) (рис. 6г). Добавление пепсина с транс-стороны камеры не вызвало значительного изменения текущих записей (рис. 6д, кривая 2), предположительно из-за большого размера фермента по сравнению с диаметром нанопоры. Однако наличие IgG в канале приводило к появлению чередующихся блокировок тока с частотой событий ($f = 30 \pm 8$ Гц) (рис. 6д, кривая 3). Примечательно, что добавление пепсина ($t = 5$ мин) привело к резкому снижению частоты событий ($f = 5 \pm 2$ Гц, (рис. 6д, кривая 4)). Полученные в результате переваривания фрагменты IgG вызвали многочисленные кратковременные блокады тока с повышенной частотой ($f = 10 \pm 2$ Гц) при $t = 70$ мин (рис. 6д, кривая 5). Таким образом, основополагающий принцип обнаружения аналита в данном случае заключался в том, что степень расщепления молекулы IgG коррелировала с изменением тока в нанопоре FhuA Δ C/ Δ 4L, индуцированного появлением IgG-фрагментов.

По сравнению с мультисубъединичными белками мономерный порин OmpG *E. coli* особенно привлекателен для формирования нанопор, поскольку необходимые модификации канала могут быть легко достигнуты путем мутагенеза. Предыдущие исследования показали, что канал OmpG подвергается pH-зависимому, вольт-зависимому или самопроизвольному закрытию, что может мешать обнаружению аналита. Чтобы устранить эти нежелательные явления, авторы определили участки OmpG, причастные к стробированию, применив для идентификации методы молекулярной динамики. Для обеспечения стабильности открытой конформации белка были использованы два подхода сайт-направленного мутагенеза. Во-первых, подвижность петли 6 была уменьшена введением дисульфидной связи между внеклеточными концами 12-го и 13-го β -тяжей барреля. Во-вторых, водородная связь между 11-м и 12-м β -тяжами была оптимизирована делецией остатка D215. Порин OmpG с обеими стабилизирующими мутациями показал снижение способности к закрытию канала на 95% [66].

Одним из наиболее успешных примеров применения сенсоров на основе липидных бислоев является анализ последовательности нуклеоти-

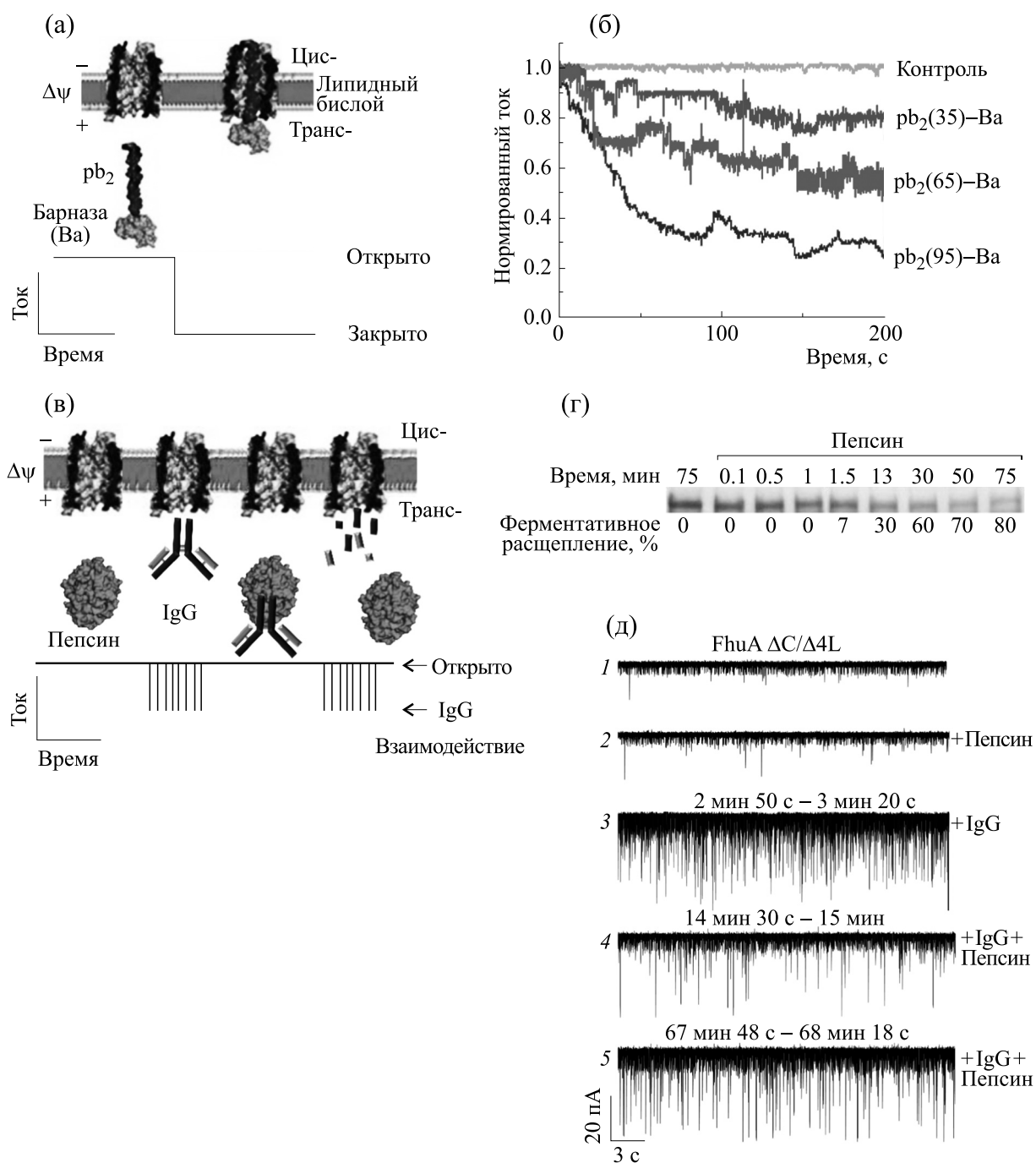


Рис. 6. Использование сконструированной (генно-инженерной) нанопоры на основе белка FhuA $\Delta C/\Delta 4L$ в качестве одномолекулярного зонда для анализа свернутых белковых доменов, содержащих ведущие (лидерные) полипептиды различной длины ((а) и (б)) и анализа ферментативного расщепления в реальном времени (в–д) ([65], с изменениями). (а) – Схема взаимодействия белковых аналитов $pb_2(35)-Ba$, $pb_2(65)-Ba$ и $pb_2(95)-Ba$ с ведущими положительно заряженными последовательностями длиной 35, 65 и 95 остатков соответственно. (б) – Характерный макроскопический спад тока в сконструированной нанопоре FhuA $\Delta C/\Delta 4L$. (в) – Схема взаимодействия сывороточного иммуноглобулина (IgG) с пепсином; (г) – ферментативная активность пепсина; (д) – записи тока, индуцированного в нанопоре FhuA $\Delta C/\Delta 4L$ появлением фрагментов IgG.

дов в нуклеиновых кислотах с помощью биологической нанопоры на основе альфа-гемолизина (рис. 7). Эта технология секвенирования ДНК с

использованием белковых нанопор была разработана благодаря тому, что четыре азотистых основания в цепочке целевой ДНК по-разному вза-

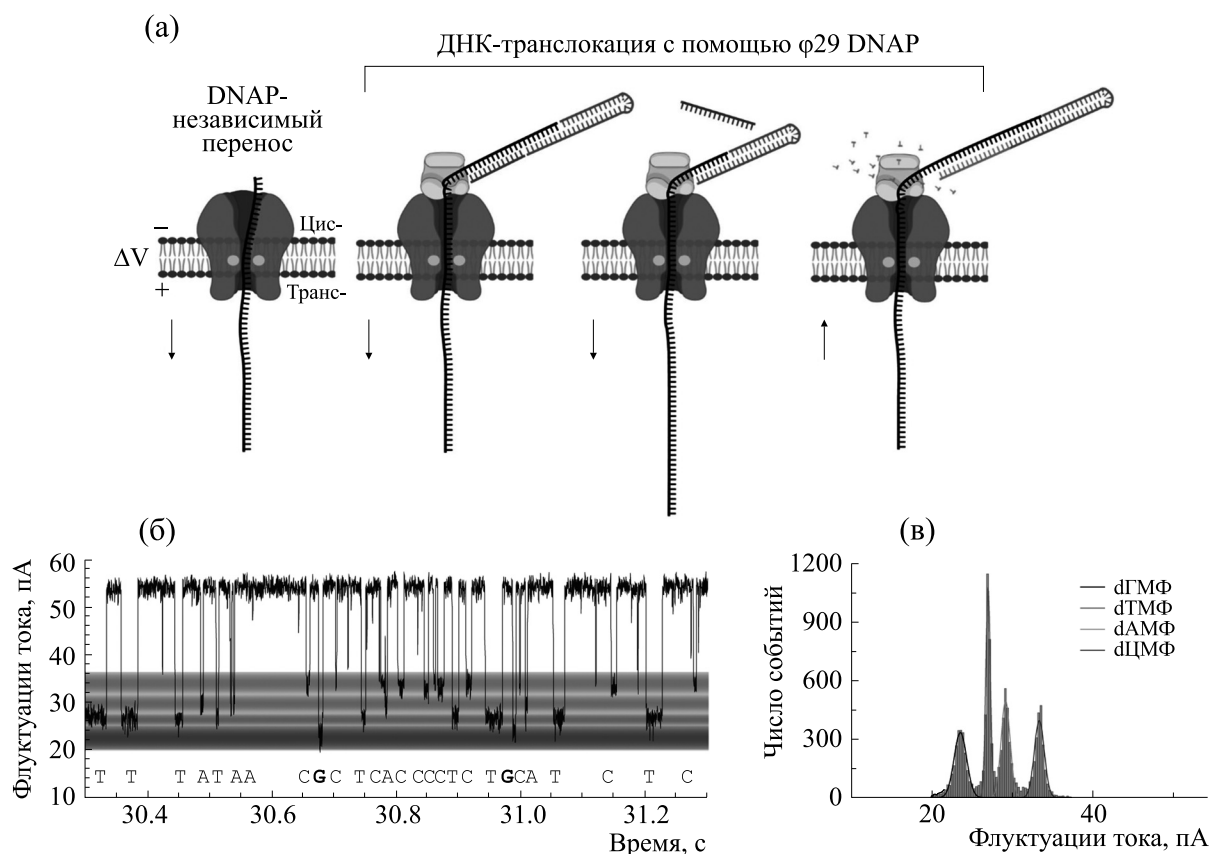


Рис. 7. Детектирование нуклеиновых кислот на основе нанопор ([67, 68], с изменениями). (а) — Модель, иллюстрирующая принцип секвенирования нити нуклеиновой кислоты: нить нуклеиновой кислоты входит в нанопору, вызывая резкое уменьшение ионного тока по сравнению с исходным током открытой поры; проходит через полость нанопоры, что приводит к характерному изменению тока и длительности блокады, и в конечном итоге перемещается через пору, позволяя ионному току вернуться в исходное состояние. (б) — Запись тока единичной поры при прохождении через нее нити нуклеиновой кислоты. (в) — Гистограмма, демонстрирующая различные уровни блокировки тока, генерируемого в результате взаимодействия монофосфатов с порой.

имеют с просветом поры α -гемолизина, показывая разные уровни проводимости при блокировке тока [67, 68].

Производительность и селективность биомиметических платформ на основе трансмембранных белков намного превосходят традиционные материальные платформы, но отсутствие стабильности во многом ограничивает их коммерческое использование. К настоящему времени достаточно хорошо разработаны трансмембранные биомиметические платформы на основе белков для четырех основных областей применения: биосенсоры, изучение молекулярных взаимодействий, аккумуляция энергии и очистка воды [69]. Примеры использования биосенсорных систем схематически представлены на рис. 8.

С точки зрения разработки биосенсоров, использующих функциональные свойства мембранных белков, можно выделить биосенсоры, сформированные на двух различных платформах: платформе на основе липидного бислоя и плат-

форме на основе клеток [70]. На липидных двухслойных платформах мембранные белки встроены в липидный бислой, который соединяет белок и сенсорное устройство, а на клеточных платформах мембранные белки экспрессируются в культивируемой клетке, которая затем интегрируется в сенсорное устройство. Исследования, связанные с химическими сенсорами на основе клеток, в основном проводились с конца 1980-х годов [71, 72], однако наибольшим прогрессом в разработке датчиков на основе клеток было ознаменовано начало 2000-х годов [73, 74]. Принципы работы соответствующих систем основаны на реакции клеток на химические стимулы. В основном существуют два типа технологий датчиков-преобразователей на основе клеток, которые основаны на детектировании электрических изменений и флуоресцентного или люминесцентного излучения. Так, в последнее время значительный прогресс наметился в применении полупроводниковых квантовых точек в качестве меток в двух важ-

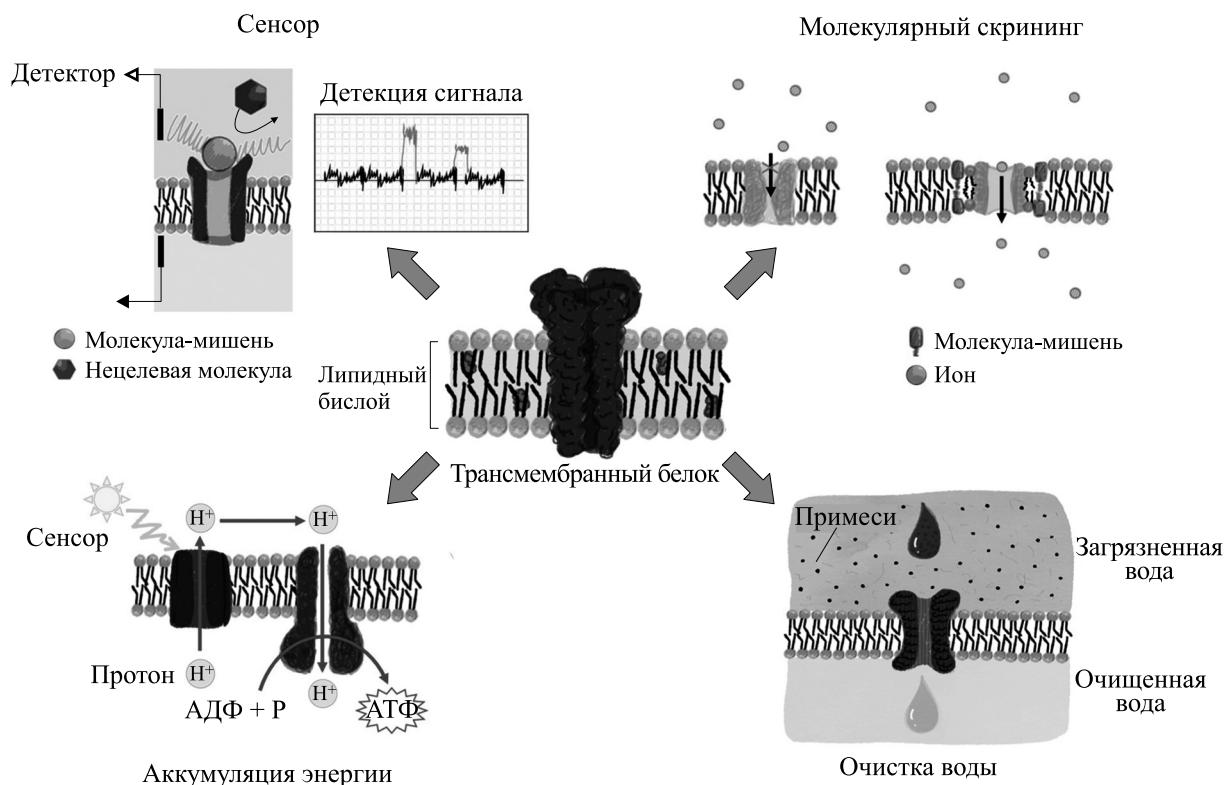


Рис. 8. Потенциально возможные области применения биосенсоров на основе трансмембранных белков: взаимодействие мембран/мембранных белков с лекарственными препаратами, генерация энергии и очистка воды ([69], с изменениями).

ных областях биологии, биовизуализации и биосенсинга [14, 15].

Для дальнейшего развития этой области вместо простых наноструктур (с использованием однокомпонентных наноматериалов и монотонных по композиции) необходимы очень сложные и продуманно созданные ансамбли качественно новых наноматериалов [75, 76]. Многие живые биологические системы являются непревзойденными «природными мастерами» в области био- и химического синтеза, они производят бионеорганические материалы, которые организованы в структуры различного уровня иерархии, от нано- до макромасштабов. Недавние исследования по использованию микроорганизмов в синтезе наночастиц являются относительно новой и захватывающей областью исследований со значительным потенциалом для развития. Микробы, благодаря пористой структуре их клеточной стенки, представляют собой исключительно эффективные шаблоны, которые обеспечивают биомиметический подход к получению упорядоченных нано-, микро- и мезоструктурированных материалов, разнообразных по размерам и форме и наличию на их поверхности множества химических

функциональных групп. В качестве биосистем микробы могут быть использованы для синтеза новых бионаноматериалов, микроустройств и микро/нанороботов и т. п. [77].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нативные или искусственно сконструированные биосенсоры с использованием ион-проводящих каналов являются весьма перспективным классом наноструктур: во-первых, из-за возможности фиксирования изменений проводимости единичной поры, так называемый стохастический мониторинг, что повышает степень точности при определении аналита, и, во-вторых, из-за того, что фиксируемый сигнал может быть оцифрован. Подготовка функциональных поверхностей для иммобилизации желаемых биомолекул, так называемая био-нанопаттернизация поверхностей, — это первый шаг в процессе изготовления биодатчиков. От успешного решения методических проблем в области био-нанопаттернизации зависит точное моделирование биомолекул на поверхностях с нанометровым разрешением и,

соответственно, эффективность конструируемой впоследствии биоматрицы, поскольку основополагающим условием для получения разнообразных биоинженерных конструкций, пригодных для создания биосенсоров, является иммобилизация белков в определенном положении, непременно при условии сохранения их биологической активности [78]. За последние несколько лет технология бионанопаттернизации развивается быстрыми темпами, разрабатываются различные методики формирования паттерна для иммобилизации биомолекул, таких как ДНК, пептиды, белки и вирусы в наномасштабе [79]. Диапазон аналитов, определяемых с помощью современных биосенсоров, достаточно широк, среди них инсектициды, пестициды, гербициды, металлы, токсины, антибиотики, микроорганизмы, гормоны и т. д. [80]. Под действием электрофоретической силы молекулы анализируемого вещества переносятся к нанопоре и нарушают протекающий ионный ток через поры. Связывание молекулы-мишени мембранные белки спонтанно преобразуют в электрические сигналы. При этом характер блокировки тока существенно меняется из-за разницы во взаимодействии между просветами пор и аналитом, а также в зависимости от разновидностей нанопор. Соответственно, тот или иной аналит можно определить по динамике изменения ионного тока, характер этих изменений служит своеобразным «отпечатком пальца» аналита.

Таким образом, создание универсальных биодатчиков на основе функционально активных трансмембранных белков, имитирующих клеточную мембрану, не только еще раз подтвердило их биологическую значимость, но и продемонстрировало возможность использования этих белков в качестве эффективных нанотехнологических инструментов. Область применения биологических пор очень широка: она простирается от сверхчувствительных биосенсоров различного назначения до целенаправленного уничтожения злокачественных клеток. К подобным структурам, применяемым в наномедицине, относятся био-генные наночастицы терапевтического назначения, искусственно сконструированные химические и биологические сенсоры [81].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-03-00318).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Н. В. Медведева, О. М. Ипатова, Ю. Д. Иванов и др., Биомед. химия 52 (6), 529 (2006).
2. А. И. Арчаков, *Нанобиотехнологии в медицине: Нанодиагностика и нанолечения* (Актовая речь, 13.04.2009).
3. D. C. Kim and D. J. Kang, Appl. Sensors **8**, 6605 (2008).
4. F. Long, A. Zhu, and H. Shi, Sensors (Basel) **13** (10), 13928 (2013).
5. C. G. Palivan, R. Goers, A. Najer, et al., Chem. Soc. Rev. **45**, 377 (2015).
6. I. Y. Hasan and A. Mechler, Analyst **142**, 3062 (2017).
7. A. Krywko-Cendrowska, S. di Leone, M. Bina, et al., Polymers (Basel) **12**(5), 1003 (2020).
8. Y. Yamamoto and H. Hori, Rev. Adv. Mater. Sci. **12**, 23 (2006).
9. I. Kusters, G., van den Bogaart, and A. Kedrov, Structure **19**, 430 (2011).
10. K. Mahendran, R. Romero-Rui, M. Schlösinger, et al., Biophys. J. **102**, 39 (2012).
11. H. Wang, T.-S. Chung, Y. W. Tong, et al., Small **8**, 1185 (2012).
12. M. Bieligmeyer, F. Artukovic, S. Nussberger, et al., Beilstein J. Nanotechnol. **7**, 881 (2016).
13. V. Lesnyak, N. Gaponik, and A. Eychmüller, Chem. Soc. Rev. **42** (7), 2905 (2013).
14. D. Mo, L. Hu, G. Zeng, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. **101** (7), 2713 (2017).
15. I. V. Martynenko, A. P. Litvin, F. Purcell-Milton, et al., J. Mater. Chem. B **5** (33), 6701 (2017).
16. D. S. Shah, M. B. Thomas, S. Phillips, et al., Biochem. Soc. Trans. **35** (3), 522 (2007).
17. B. Hagan and J. Lakma, Molec. Membrane Biol. **21**, 209 (2004).
18. P. Curnow, Biochem. Soc. Trans. **37**, 643 (2009).
19. О. Д. Новикова и Т. Ф. Соловьева, Биол. мембраны **26** (1), 6 (2009).
20. G. E. Schulz, Biochim. Biophys. Acta **1565**, 308 (2002).
21. G. N. Likhatskaya, T. F. Solov'eva, O. D. Novikova, et al., J. Biomol. Struct. Dyn. **23** (2), 163 (2005).
22. A. Wiese, G., Schroder, K. Brandenburg, et al., Biochim. Biophys. Acta **1190**, 231 (1994).
23. D. J. Muller and A. Engel, Curr. Opin. Colloid Interface Sci. **13** (5), 338 (2008).

24. L. Hasler, J. B. Heymann, A. Engel., et al., J. Struct. Biol. **121**, 162 (1998).
25. Б. Глик и Д. Пастернак, *Молекулярная биотехнология: принципы и применение* (Мир, М., 2002).
26. G. A. Signorell, T. Kaufmann, C. W. Kukulski, et al., J. Struct. Biol. **157**, 321 (2007).
27. M. Sheereen, E. Yusko, Y. Billeh, et al., Curr. Opin. Biotechnol. **21** (4), 439 (2010).
28. S. Howorka, Nature Nanotechnol. **12**, 619 (2017).
29. T. L. Williams, M. M. L. Vareiro, and A. T. Jenkins, Langmuir **22**, 6473 (2006).
30. P. H Lu, R. H. Liu, and F. J. Sharom, Eur. J. Biochem. **268**, 1687 (2001).
31. A. J. Heron, J. R. Thompson, B. Cronin, et al., J. Am. Chem. Soc. **131**, 1652 (2009).
32. M. A. Dhoke, P. J. Ladha, F. J. Boerio, et al., Biochim. Biophys. Acta **1716**, 117 (2005).
33. L. Tiefenauer and S. Demarche, Materials **5**, 2205 (2012).
34. H. Ti Tien, S. H. Wurster, and A. L. Ottova, Bioelectrochem. Bioenergetics **42** (1), 77 (1997).
35. A. Janshoff and C. Steinem, Anal. Bioanal. Chem. **385** (3), 433 (2006).
36. L. X. Tiefenauer and A. Studer, Biointerphases **3** (2), 74 (2008).
37. A. Janshoff and C. Steinem, Anal. Bioanal. Chem. **385**, 433 (2006).
38. E. Reimhult and K. Kumar, Trends Biotechnol. **26** (2), 82 (2008).
39. A. A. Brian and H. M. McConnell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 6159 (1984).
40. L. K. Tamm and H. M. McConnel, Biophys. J. **47** (1), 105, (1985).
41. H. Hillebrandt, G. Wiegand, M. Tanaka, et al., Langmuir **15**, 8451 (1999).
42. A. Ottova, V. Tovarozek, and H. T. Tien, in *Planar lipid bilayers (BLMs) and their applications*, Ed. by H. Tien and A. Ottova-Leitmannova (Elsevier, New York, 2003), pp. 917–920.
43. E. T. Castellana and P. S. Cremer, Surf. Sci. Rep. **61** (10), 429 (2006).
44. G. D. Bothun, J. Nanobiotechnol. **6**, 13 (2008).
45. A. R. Zolghadr and S. S. Moosavi, RSC Advances **9** (9), 5197 (2019).
46. G. Elender, M. Kühner, E. Sackmann, Biosens. Bioelectronics **11**, 565 (1996).
47. F. Itel, M. Chami, A. Najer, et al., Macromolecules **47**, 21, 7588 (2014).
48. E.-K. Sinner and W. Knoll, Curr. Opin. Chem. Biol. **5**, 705 (2001).
49. K. Eva, M. Schmitt, A. Vrouenraets, et al., Biophys. J. **91**, 2163, (2006).
50. Г. А. Набережных, А. А. Карпенко, В. А. Хоменко и др., Биофизика **64** (6), 1107 (2019).
51. A. Skerra, J. Mol. Recognit. **13** (4), 167 (2000).
52. W. Ma, A. Saccardo, D. Roccato, et al., Nat. Commun. **9**, 1489 (2018).
53. K. Wadu-Mesthrige, N. A. Amro, and J. C. Garno, Biophys. J. **80** (4), 1891 (2001).
54. C. Mathé, S. Devineau, J.-C. Aude, et al., PLoS One **8** (11), 81346 (2013).
55. F. Aldeek, M. Safi, N. Zhan, et al., ACS Nano **7** (11), 10197 (2013).
56. Z. Jin, Y. Sugiyama, C. Zhang, et al., Chem. Mater. **32** (17), 7469 (2020).
57. D. C. Kim and D. J. Kang, Sensors **8** (10), 6605, (2008).
58. E. Topoglidis, C. J. Campbell, A. E. G. Cass, et al., Langmuir **17** (25), 7899 (2001).
59. J. L. Poulos, T.-J. Damoiseaux, E. J. Gillespie, et al., Biosens. Bioelectron. **24**, 1806 (2009).
60. M. A. Czekalska, T. S. Kaminski, S. Jakiela, et al., Lab. Chip **15**, 541 (2015).
61. E. Berkane., F. Orlik., A. Charbit, et al., J. Nanobiotechnol. **3**, 3 (2005).
62. E. M. Nestorovich, C. Danelon, M. Winterhalter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99** (15), 9789 (2002).
63. T. Stora, J. H. Lakey, and H. Vogel, Angew. Chem. Int. Ed. **38**, 389 (1999).
64. O. Braha, S. J. Walker, and A. Cheley, Chemistry Biology **4** (7), 497 (1997).
65. M. M. Mohammad, R. Iyer, K. R. Howard, et al., J. Am. Chem. Soc. **134** (22), 952 (2012).
66. S. Conlan, Y. Zhang, S. Cheley, et al., Biochemistry **39**, 11845 (2000).
67. J. Clarke, H.-C. Wu, L. Jayasinghe, et al., Nat. Nanotechnol. **4**, 265 (2009).
68. A. Crnković, M. Srnko, and G. Anderluh, Life **11**, 27 (2021).
69. H. Ryu, A. Fuwad, S. Yoon, et al., Int. J. Mol. Sci. **20**, 1437 (2019).
70. N. Misawa, T. Osaki, and S. Takeuchi, J. R. Soc. Interface **15**, 20170952 (2018).
71. D. M. Rawson, A. J. Willmer, and A. P. P. Turner, Biosensors **4**, 299 (1989).
72. L. Bousse and L. Sens, Actuators B Chem. **34**, 270 (1996).
73. D. A. Stenger, G. W. Gross, E. W. Keefer, et al., Trends Biotechnol. **19**, 304 (2001).
74. J. Ko and T. H. Park, J. Biol. Eng. **10**, 17 (2016).
75. K. Ariga, M. Li, G. J. Richards, et al., J. Nanosci. Nanotechnol. **11** (1), 1 (2011).
76. M. Ramanathan, K. Hong, Q. Ji, et al., J. Nanosci. Nanotechnol. **14** (1), 390 (2014).
77. D. Mandal, M. E. Bolander, D. Mukhopadhyay, et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. **69** (5), 485, (2006).
78. K. L. Christman, V. D. E. Rios, and H. D. Maynard, Soft Matter. **2**, 928 (2006).
79. P. M. Mendes, C. L. Yeung, and J. A. Preece, Res. Lett. **2** (8), 373 (2007).
80. G. P. Nikoleli, D. P. Nikolelis, and C. G. Siontorou, Membranes (Basel) **8** (4), 108 (2018).
81. H. Pradeep and G. K. Rajanikant, Nanobiotechnology **6** (2), 63 (2012).

Nanostructural Biosensors Based on Components of Bacterial Membranes

O.D. Novikova*, G.A. Naberezhnykh*, and A.A. Sergeev**

**G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, prosp. 100 Let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022 Russia*

***Institute of Automation and Control Processes, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Radio 5, Vladivostok, 690041 Russia*

Protein molecules have the unique property of transferring material and/or information through an impenetrable barrier called lipid bilayer. This peculiar role of cellular “gatekeepers” is especially interesting for the purposes of nanobiotechnology, since membrane proteins can be successfully used for communication between two different media separated by a lipid bilayer. This review describes the structural features and properties of transmembrane proteins as the most promising components of modern biosensor devices. Methods for the formation of lipid bilayers attached to a solid surface as well as methods for obtaining a rigid protein “armature” are also presented. With the use of these techniques it is possible to reconstruct and maintain proteins in a functionally active conformation in regard to a wide range of analytes to be determined. The high selectivity and specificity of protein molecules in recognizing receptors or ligands make them indispensable for biomedical analysis and molecular diagnostics.

Keywords: nanostructured biosensors, transmembrane proteins, lipid bilayer