

©Коллектив авторов

РЕГИСТРАЦИЯ АКТИВНОСТИ ЕДИНИЧНОЙ МОЛЕКУЛЫ ПЕРОКСИДАЗЫ ХРЕНА С ПОМОЩЬЮ ДЕТЕКТОРА НА БАЗЕ ТВЕРДОТЕЛЬНОЙ НАНОПОРЫ

Ю.Д. Иванов¹, А.Н. Аблеев¹, А.В. Виноградова¹, Е.Д. Неведрова¹, И.Д. Шумов^{1}, В.С. Зиборов¹, А.Ф. Козлов¹, И.А. Иванова¹, Н.В. Ваулин^{2,3}, Д.В. Лебедев^{2,3}, А.С. Букатин^{2,3}, И.С. Мухин^{2,3}, Е.А. Пономаренко¹, А.И. Арчаков¹*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: shum230988@mail.ru

²Академический университет имени Ж.И. Алферова, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 8, корп. 3

³Институт аналитического приборостроения, 190103, Санкт-Петербург, ул. Ивана Черных, 31–33

В настоящей работе продемонстрировано использование твердотельного нанопорового детектора для мониторинга активности единичной молекулы модельного фермента — пероксидазы хрена (ПХ). Этот детектор включал в себя измерительную ячейку, разделенную на цис- и транс-камеры чипом из нитрида кремния (SiN структуры) с нанопорой диаметром 5 нм. Для встраивания единичной молекулы ПХ в нанопору, в цис-камеру помещали электрод и прикладывали к нему отрицательное напряжение, после чего в эту камеру добавляли раствор ПХ. После этого проводили реакцию окисления субстрата ПХ — 2,2-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) (АБТС) — этой молекулой в присутствии пероксида водорода. В процессе этой реакции проводили мониторинг функционирования встроеной в нанопору единичной молекулы ПХ путём регистрации зависимости ионного тока, протекающего через нанопору, от времени. Предложенный в нашей работе подход может позволить в дальнейшем исследовать функционирование различных ферментов на уровне единичных молекул, что является важным шагом в развитии энзимологии единичных молекул.

Ключевые слова: нанопоровый детектор; ферментативная активность; нанопора; энзимология единичных молекул

DOI: 10.18097/PBMC20247005349

ВВЕДЕНИЕ

Протеомные данные гораздо труднее анализировать, чем геномные [1]. Это связано с тем, что не существует методов амплификации белков, и уровень экспрессии белка не может быть предсказан исходя из уровня транскрипции [2–4]. В этой связи важным направлением в протеомике является разработка и развитие методов, позволяющих анализировать единичные молекулы белков.

Современные методы, такие как рентгеноструктурный анализ (РСА) или ядерный магнитный резонанс (ЯМР), хотя и позволяют исследовать структуру единичных молекул белков, но, тем не менее, не позволяют получить информацию о функционировании единичной белковой молекулы в реальном времени [5].

В то же время, нанотехнологические подходы, основанные на использовании нанопоровых, атомно-силовых и нанопроводных детекторов, обеспечивают создание уникальных платформ для детекции единичных биологических макромолекул и исследования их функциональных свойств.

Одним из наиболее популярных методов, который позволяет исследовать единичные молекулы ферментов и их функционирование, в настоящее время является метод атомно-силовой микроскопии (АСМ) [6–8]. Недостатками метода АСМ являются дороговизна используемого в нём оборудования, а также необходимость иммобилизации исследуемых

биологических макромолекул на поверхности твёрдой подложки. Последнее обстоятельство может сказываться на свойствах исследуемых биологических макромолекул.

К нанотехнологическим методам также относится метод нанопроводной детекции, который используют для исследований единичных вирусных частиц [9]. В контексте исследований белковых молекул данный метод используется в основном для изучения взаимодействий этих молекул с другими молекулами, а не для исследования функционирования единичных белковых молекул [10].

Недавно предложен новый метод исследования белков на базе нанопорового детектирования [11]. Базовый принцип использования нанопор заключается в том, что при функционировании макромолекул в нанопоре наблюдается флуктуация ионного тока, протекающего через эту нанопору. В нанопоровом детекторе перегородка с нанопорой разделяет две камеры (цис- и транс-), к которым подведены два электрода, посредством которых поддерживается напряжение между этими камерами (рис. 1).

В процессе измерений с помощью нанопорового детектора регистрируют ионный ток, протекающий через нанопору. В нанопору обычно встраивают молекулу белка, что позволяет следить за её поведением по изменению ионного тока, протекающего через эту нанопору [5, 12–16].

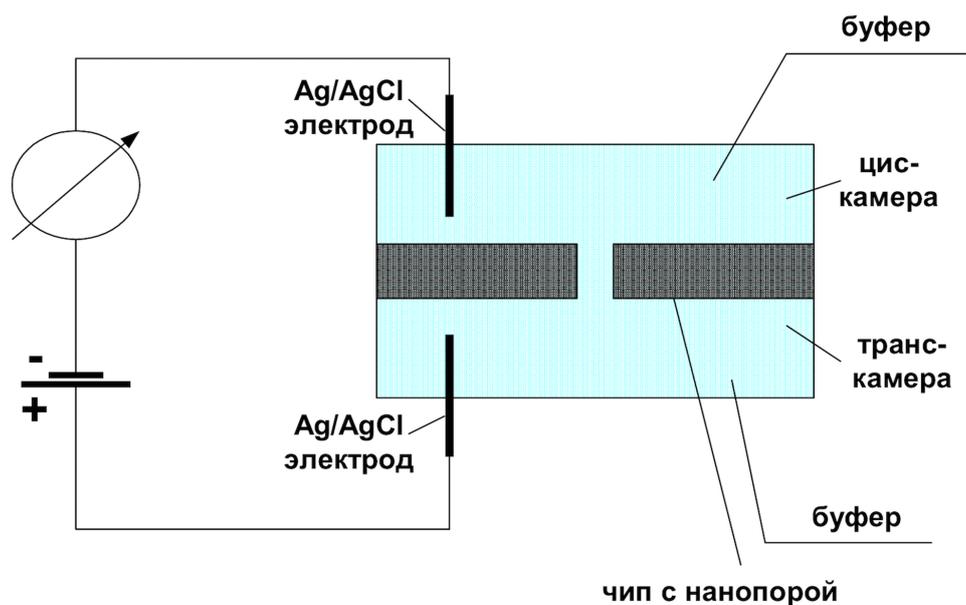


Рисунок 1. Общая схема нанопорового детектора на базе твердотельной нанопоры.

Нанопоровые детекторы условно можно разделить на два класса: детекторы на базе биологических нанопор и детекторы на базе твердотельных нанопор. Биологические нанопоры формируют на основе биологических структур — а именно, на базе биологических мембран, в которые встраивают белковые молекулы, формирующие нанопоры. Хотя детекторы на базе биологических структур обладают высокой чувствительностью, их недостатками в то же время являются их нестабильность и чувствительность к изменениям условий эксперимента — таким, как pH, температура и ряд других факторов. Твердотельные нанопоры более стабильны по отношению к этим факторам и, поэтому, более предпочтительны для использования в нанопоровых детекторах.

Твердотельные нанопоры имеют большой потенциал для исследования поведения единичных молекул. Это обусловлено высокой чувствительностью нанопоры, которая позволяет проводить детекцию биомолекул даже на субнаномолярном уровне [17]. Такая высокая чувствительность твердотельной нанопоры объясняется тем, что её размер (диаметр) находится в том же диапазоне, что и размер исследуемых единичных биологических макромолекул [18, 19]. В качестве нанопоровых структур зачастую используются структуры на основе кремния (Si, SiO₂, Si₃N₄), стекла, графена, оксидов металлов (Al₂O₃, HfO₂, TiO₂), полимеров, например, полиэтилентерефталата (ПЭТФ, лавсана), полиимидов, поликарбоната. Также используются композитные мембраны (MoS₂/SiN_x; Si₃N₄/SiO₂; графен/Al₂O₃). Разнообразие материалов, пригодных для изготовления твердотельных нанопор, позволяет получать мембраны с различными физико-химическими свойствами [17, 20–23].

Твердотельные нанопоры могут быть изготовлены различными методами, включая “просверливание” нанопоры электронным пучком

(electron beam drilling, EBD), использование контролируемого пробоя диэлектрика (SDB), создание нанопоры сфокусированным ионным пучком (focused ion beam, FIB) [22, 24–26].

Одним из интересных и важных для развития медицины и биотехнологии ферментов является пероксидаза хрена (ПХ; КФ: 1.11.1.7). Интерес к ПХ обусловлен также тем, что этот фермент является модельным белком, широко используемым при изучении ферментов пероксидаз, играющих важную роль в различных биохимических процессах [27]. Фермент ПХ катализирует реакции окисления различных органических и неорганических молекул в присутствии пероксида водорода (H₂O₂) [28]. Его молекулярная масса составляет 40–44 кДа [29, 30], что соответствует размеру молекулы около 5 нм [31]. Ранее функционирование молекулы ПХ исследовали с помощью нанопорового детектора, встраивая её в нанопору, однако размеры этой нанопоры были достаточно большие и намного превышали размеры молекулы ПХ [32, 33].

В настоящей работе был сконструирован нанопоровый детектор, в котором единичную молекулу ПХ встраивали со стороны цис-камеры, к которой прикладывали отрицательное напряжение. В качестве нанопоры использовали твердотельную нанопору на базе нитрида кремния (Si₃N₄, далее по тексту SiN). Функционирование единичной молекулы фермента ПХ в присутствии его субстрата 2,2-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната) (АБТС) в присутствии H₂O₂ проводили при таком способе подачи напряжения на измерительную ячейку.

МЕТОДИКА

В экспериментах использовали 2 мМ фосфатно-солевой буферный раствор в модификации Дульбекко с pH 7,4 (ФСБ-Д), который готовили с использованием сверхчистой деионизованной воды из готовой смеси

солей, закупленной в “Pierce” (США). Сверхчистую деионизованную воду получали с использованием системы Simplicity UV (“Millipore”, Франция).

Пероксидаза из корней хрена (ПХ) была приобретена в фирме “Sigma” (США; каталожный номер Р6782; обессоленный лиофилизированный порошок; активность по АБТС 1995 ед./мг, RZ 3,0 [34]). В этой же фирме был приобретен субстрат АБТС (2,2-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат); каталожный номер А1888). Для экспериментов готовили 0,3 мМ раствор АБТС в буфере ФСБ-Д. Пероксид водорода использовали при концентрации H_2O_2 0,003% (об./об.) в 2 мМ ФСБ-Д.

Изготовление нанопоры

Исходя из того, что размер молекулы ПХ составляет $4,3 \times 4,8 \times 5,8$ нм [35], была сформирована нанопора, размер которой был меньше характеристического размера молекулы ПХ. Это не позволяло молекуле ПХ

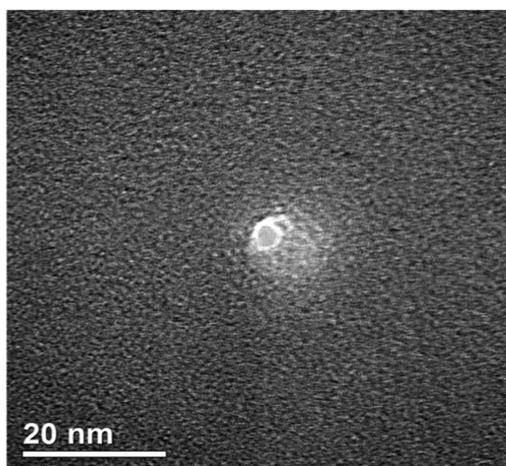


Рисунок 2. ПЭМ изображение нанопоры, сформированной методом EBD в SiN чипе.

свободно проходить через нанопору. Нанопору формировали методом EBD в SiN чипе. Нанопора имела длину 40 нм. Изображение этой поры, полученное методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), представлено на рисунке 2. Так как размер поры был меньше характеристического размера молекулы ПХ (5,8 нм), последняя могла задерживаться в этой поре, не проходя через неё в противоположную (транс-) камеру.

Изготовление нанопорового детектора

Нанопоровый детектор включал в себя измерительную ячейку. Объем этой ячейки был разделён на две (цис- и транс-) камеры. Объем каждой камеры составлял 700 мкл. Перегородкой между этими камерами служил SiN чип с нанопорой. Схема сконструированного в нашей работе нанопорового детектора представлена на рисунке 3.

Перед экспериментом обе камеры измерительной ячейки заполняли сверхчистой деионизованной водой. После этого обе ячейки заполняли буфером ФСБ-Д. При проведении измерений, между цис- и транс-камерой подавали электрическое напряжение посредством Ag/AgCl электродов, погружая их в заполненные раствором ячейки. Ионный ток, проходящий через нанопору, регистрировали в режиме реального времени. После измерений ячейку и SiN чип промывали сверхчистой деионизованной водой.

Детектор экранировали с помощью сетки Фарадея. Ионный ток, протекающий через нанопору, измеряли с помощью усилителя с внутренним уровнем шума порядка 0,3 фА в полосе частот 1000 Гц. Напряжение, подаваемое на ячейку, составляло 200 мВ. Ионный ток, протекающий через нанопору, регистрировали с помощью 16-битного аналого-цифрового преобразователя (АЦП). Для фильтрации сигнала использовали фильтр Баттерворта с частотой 1000 Гц.

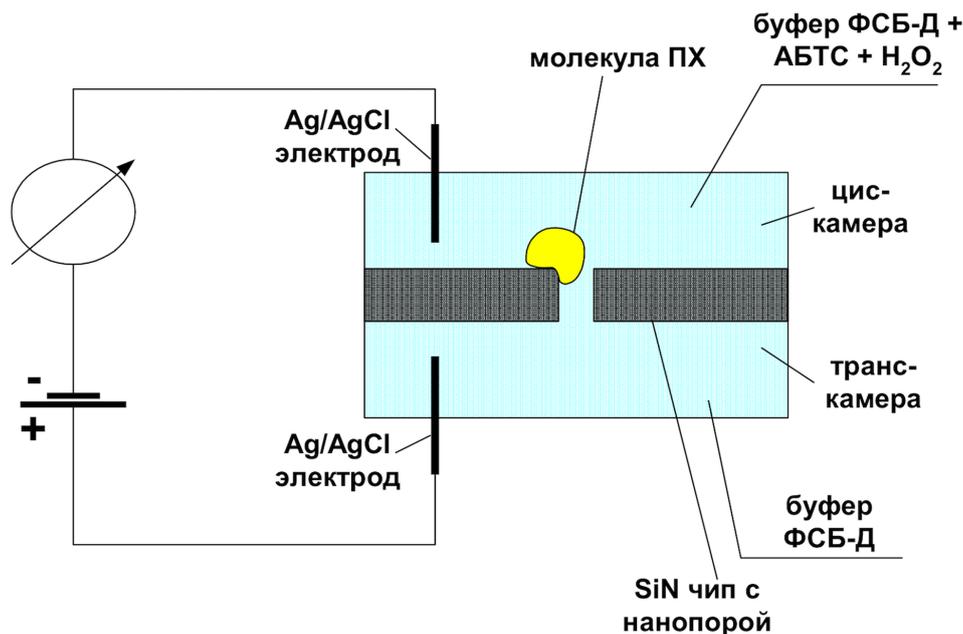


Рисунок 3. Схема нанопорового детектора на базе твердотельной нанопоры, сформированной методом EBD в SiN чипе, использованного в экспериментах с ПХ.

Спектрофотометрический контроль активности ПХ

Для подтверждения активности исследуемого фермента ПХ в условиях эксперимента на нанопоровом детекторе проводили спектрофотометрические измерения. Суть этих измерений заключалась в мониторинге поглощения раствора при длине волны 405 нм [36] в процессе реакции окисления АБТС в присутствии H_2O_2 в 2 мМ ФСБ-Д буфере с pH 7,4. Концентрации ПХ, АБТС и H_2O_2 в этих измерениях составляли 10^{-9} М [36], 0,3 мМ [36, 37] и 0,003% (об./об.), соответственно. Измерения проводили в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см на спектрофотометре модели 8453 ("Agilent Deutschland GmbH", Германия). Измерения проводили в 3 технических повторах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Контрольные эксперименты с нанопоровым детектором

Вначале были проведены контрольные эксперименты с 2 мМ ФСБ-Д без фермента. Буфер добавляли в цис- и транс-камеры; напряжение между электродами составляло 200 мВ. После этого в цис-камеру добавляли 0,3 мМ раствор АБТС в ФСБ-Д, что не вызывало изменения проводимости поры (рис. 4).

Отметим, что добавка в цис-камеру 0,003% H_2O_2 к ФСБ-Д в тех же условиях также не вызывала изменения проводимости поры (рис. 5).

Затем раствор АБТС заменяли на раствор, содержащий 0,3 мМ АБТС и 0,003% H_2O_2 в цис-камере. При этом также не наблюдалось изменений проводимости поры (рис. 6).

Регистрация активности ПХ с помощью нанопоры

В цис- и транс-камеры ячейки вначале добавляли раствор 2 мМ ФСБ-Д буфер без фермента. Далее при проведении рабочих экспериментов в цис-камеру, к которой было приложено отрицательное напряжение, добавляли фермент ПХ так, что его конечная концентрация в камере была 10^{-8} М, как показано на рисунке 7, при этом сигнал уменьшался, что указывало на небольшое закрытие поры.

После того, как наблюдалось частичное закрытие нанопоры молекулой ПХ, в ячейку добавляли раствор субстрата АБТС до концентрации его в цис-камере 0,3 мМ. После этого в ячейку вводили раствор H_2O_2 так, что на отметке времени 200 с в ячейке находился раствор, содержащий 0,3 мМ АБТС и 0,003% H_2O_2 . Присутствие H_2O_2 запускало реакцию окисления субстрата (АБТС). В процессе этой реакции наблюдались флуктуации значения ионного тока, протекающего через нанопору с появлением пиков на регистрируемой зависимости ионного тока, начиная с момента времени 450 с. При этом значение ионного тока составляло примерно -250 пА. Амплитуда наблюдаемых флуктуаций ионного тока достигала ~150 пА.

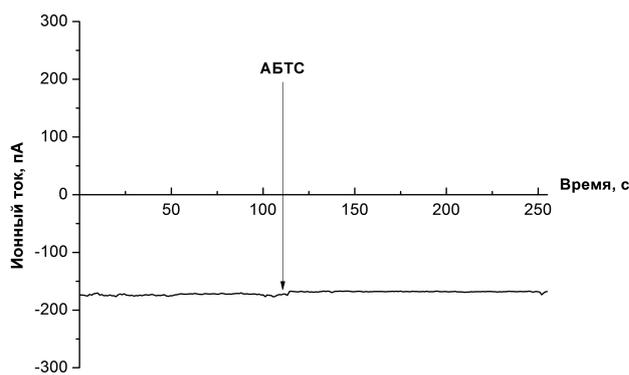


Рисунок 4. Зависимость ионного тока, протекающего через нанопору, от времени, полученная в контрольном эксперименте по определению влияния добавки АБТС. Стрелкой показан момент времени добавления в цис-камеру измерительной ячейки раствора АБТС. Конечная концентрация АБТС в измерительной ячейке – 0,3 мМ.

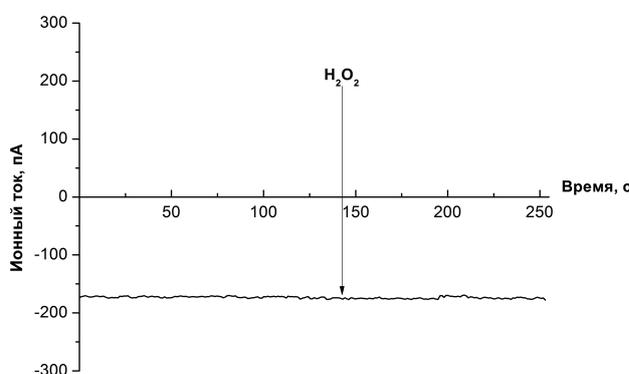


Рисунок 5. Зависимость ионного тока, протекающего через нанопору, от времени, полученная в контрольном эксперименте по определению влияния добавки H_2O_2 . Стрелкой показан момент времени добавления в цис-камеру измерительной ячейки раствора H_2O_2 . Конечная концентрация H_2O_2 в измерительной ячейке – 0,003% (об./об.).

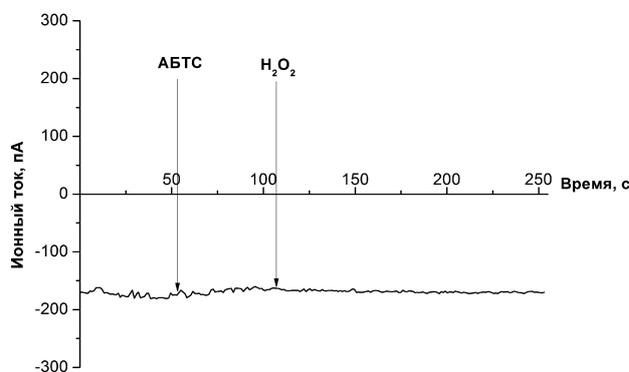


Рисунок 6. Зависимость ионного тока, протекающего через нанопору, от времени, полученная в контрольном эксперименте без фермента. Стрелкой показан момент времени добавления в цис-камеру измерительной ячейки раствора H_2O_2 . Конечные концентрации АБТС и H_2O_2 в измерительной ячейке – 0,3 мМ и 0,003% (об./об.), соответственно.

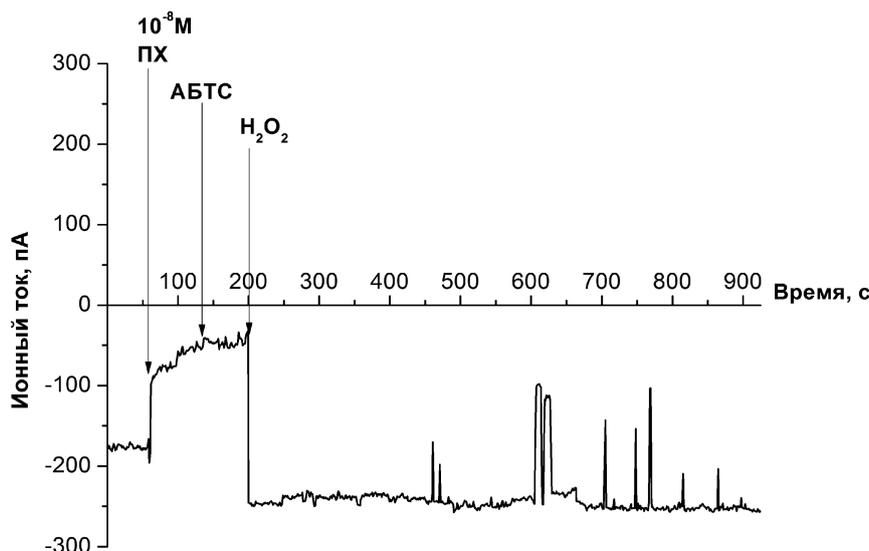


Рисунок 7. Зависимость ионного тока, протекающего через нанопору, от времени. Стрелками показаны моменты времени добавления в цис-камеру измерительной ячейки растворов ПХ, АБТС и H_2O_2 . Конечные концентрации ПХ, АБТС и H_2O_2 в измерительной ячейке — 10^{-8} М, 0,3 мМ и 0,003% (об./об.), соответственно.

Спектрофотометрическое подтверждение активности ПХ

С целью подтверждения активности ПХ в условиях эксперимента на нанопоровом детекторе при концентрациях фермента, субстрата АБТС и пероксида водорода 10^{-9} М, 0,3 мМ и 0,003% (об./об.) соответственно нами были проведены спектрофотометрические измерения, как описано в разделе “МЕТОДИКА”. Полученная в результате проведённых измерений зависимость поглощения раствора от времени представлена на рисунке 8.

Зависимость $A_{405}(t)$, представленная на рисунке 8, подтверждает, что исследуемый фермент ПХ сохраняет функциональную активность в течение всего времени наблюдения, соответствующего таковому в эксперименте на нанопоровом детекторе (~700 с).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы исследовали возможность регистрации активности единичной молекулы фермента ПХ в условиях её встраивания в нанопору со стороны цис-камеры. При этом мы использовали нанопору диаметром ~5 нм, что позволяло задерживать в ней молекулу ПХ, не давая ей возможности проникать из цис-камеры в транс-камеру. При добавлении в цис-камеру раствора ПХ одна из молекул ПХ подходила к нанопоре и перекрывала её просвет, о чём свидетельствует изменение ионного тока, протекающего через нанопору, в период времени с 60 с до 130 с. Затем, после добавления раствора субстрата в цис-камеру добавляли раствор H_2O_2 , инициируя ферментативную реакцию окисления субстрата. На рисунке 7 показаны наблюдаемые в рабочих экспериментах флуктуации сигнала. В холостых опытах (в отсутствие ПХ) АБТС или H_2O_2 не влияли на проводимость нанопоры. Таким образом, мы продемонстрировали возможность мониторинга функционирования единичной молекулы

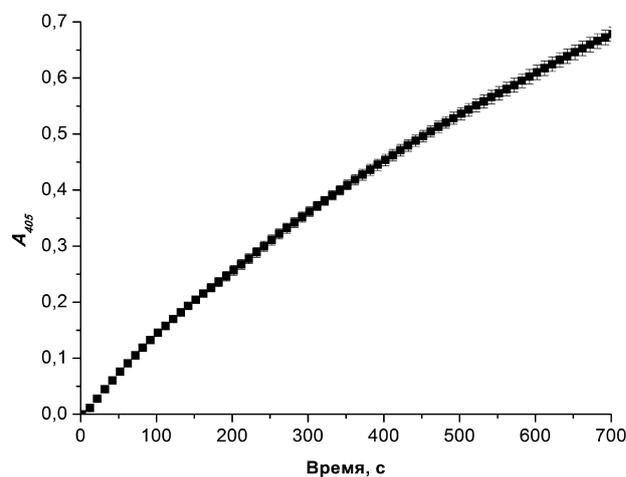


Рисунок 8. Зависимость поглощения раствора (A_{405}), содержащего ПХ, АБТС и H_2O_2 , от времени (t), полученная при длине волны 405 нм. Конечные концентрации ПХ, АБТС и H_2O_2 в кювете 10^{-9} М, 0,3 мМ и 0,003% (об./об.), соответственно. Длина оптического пути кюветы 1 см. Измерения выполняли в 2 мМ ФСБ-Д (рН 7,4).

фермента ПХ после её встраивания в нанопору со стороны цис-камеры измерительной ячейки нанопорового детектора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе была экспериментально подтверждена возможность регистрации функционирования единичной молекулы ПХ в режиме реального времени в нанопоре из SiN материала диаметром порядка 5 нм. Исследования были проведены в условиях, когда фермент был добавлен в цис-камеру. В процессе функционирования ПХ происходило окисление АБТС в присутствии пероксида водорода. При этом наблюдали флуктуации ионного тока, протекающего через нанопору, просвет которой перекрывала

молекула ПХ. Отметим, что в контрольных экспериментах (в отсутствие ПХ) таких флуктуаций ионного тока не наблюдалось. Активность фермента в условиях эксперимента была подтверждена методом спектrophотометрии. Предложенный в нашей работе подход может позволить в дальнейшем исследовать функционирование различных ферментов на уровне единичных молекул, что важно для развития энзимологии единичных молекул.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122030100168-2).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Uhlen M., Ponten F. (2005) Antibody-based proteomics for human tissue profiling. *Mol. Cell. Proteomics*, **4**(4), 384–393. DOI: 10.1074/mcp.R500009-MCP200
- Archakov A.I., Ivanov Y.D., Lisitsa A.V., Zgoda V.G. (2007) AFM fishing nanotechnology is the way to reverse the Avogadro number in proteomics. *Proteomics*, **7**(1), 4–9. DOI: 10.1002/pmic.200600467
- Gygi S.P., Rochon Y., Franza B.R., Aebersold R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **19**(3), 1720–1730. DOI: 10.1128/MCB.19.3.1720
- Futcher B., Latter G.I., Monardo P., McLaughlin C.S., Garrels J.I. (1999) A sampling of the yeast proteome. *Mol. Cell. Biol.*, **19**(11), 7357–7368. DOI: 10.1128/MCB.19.11.7357
- Luo Y., Wu L., Tu J., Lu Z. (2020) Application of solid-state nanopore in protein detection. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(8), 2808. DOI: 10.3390/ijms21082808
- Galvanetto N., Ye Z., Marchesi A., Mortal S., Maity S., Laio A., Torre V. (2022) Unfolding and identification of membrane proteins *in situ*. *eLife*, **11**, e77427. DOI: 10.7554/eLife.77427
- Radmacher M., Fritz M., Cleveland J.P., Walters D.A., Hansma P.K. (1994) Imaging adhesion forces and elasticity of lysozyme adsorbed on mica with the atomic force microscope. *Langmuir*, **10**(10), 3809–3814. DOI: 10.1021/la00022a068
- Pleshakova T.O., Bukharina N.S., Archakov A.I., Ivanov Y.D. (2018) Atomic force microscopy for protein detection and their physicochemical characterization. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**(4), 1142. DOI: 10.3390/ijms19041142
- Patolsky F., Zheng G., Hayden O., Lakadamyali M., Zhuang X., Lieber C.M. (2004) Electrical detection of single viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**(39), 14017–14022. DOI: 10.1073/pnas.0406159101
- Omichi M., Asano A., Tsukuda S., Takano K., Sugimoto M., Saeki A., Sakamaki D., Onoda D., Hayashi T., Seki S. (2014) Fabrication of enzyme-degradable and size-controlled protein nanowires using single particle nano-fabrication technique. *Nat. Commun.*, **5**(1), 3718. DOI: 10.1038/ncomms4718
- Ying C., Ma T., Xu L., Rahmani M. (2022) Localized nanopore fabrication via controlled breakdown. *Nanomaterials*, **12**(14), 2384. DOI: 10.3390/nano12142384
- Sheng Y., Zhang S., Liu L., Wu H.C. (2020) Measuring enzymatic activities with nanopores. *ChemBioChem*, **21**(15), 2089–2097. DOI: 10.1002/cbic.202000079
- Pham B., Eron S.J., Hill M.E., Li X., Fahie M.A., Hardy J.A., Chen M. (2019) A nanopore approach for analysis of caspase-7 activity in cell lysates. *Biophys. J.*, **117**(5), 844–855. DOI: 10.1016/j.bpj.2019.07.045
- Chen H., Lin Y., Long Y.T., Minter S.D., Ying Y.L. (2022) Nanopore-based measurement of the interaction of P450cam monooxygenase and putidaredoxin at the single-molecule level. *Faraday Discussions*, **233**, 295–302. DOI: 10.1039/D1FD00042J
- Wloka C., van Meervelt V., van Gelder D., Danda N., Jager N., Williams C.P., Maglia G. (2017) Label-free and real-time detection of protein ubiquitination with a biological nanopore. *ACS Nano*, **11**(5), 4387–4394. DOI: 10.1021/acsnano.6b07760
- Willems K., van Meervelt V., Wloka C., Maglia G. (2017) Single-molecule nanopore enzymology. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **372**(1726), 20160230. DOI: 10.1098/rstb.2016.0230
- Lee K., Park K.B., Kim H.J., Yu J.S., Chae H., Kim H.M., Kim K.B. (2018) Recent progress in solid-state nanopores. *Adv. Mater.*, **30**(42), 1704680. DOI: 10.1002/adma.201704680
- Steinbock L.J., Krishnan S., Bulushev R.D., Borgeaud S., Blokesch M., Feletti L., Radenovic A. (2014) Probing the size of proteins with glass nanopores. *Nanoscale*, **6**(23), 14380–14387. DOI: 10.1039/C4NR05001K
- Lee M.H., Kumar A., Park K.B., Cho S.Y., Kim H.M., Lim M.C. (2014) A low-noise solid-state nanopore platform based on a highly insulating substrate. *Sci. Rep.*, **4**(1), 7448. DOI: 10.1038/srep07448
- Deamer D., Akeson M., Branton D. (2016) Three decades of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol.*, **34**(5), 518–524. DOI: 10.1038/nbt.3423
- Pérez-Mitta G., Toimil-Molares M.E., Trautmann C., Marmisollé W.A., Azzaroni O. (2019) Molecular design of solid-state nanopores: Fundamental concepts and applications. *Adv. Mater.*, **31**(37), 1901483. DOI: 10.1002/adma.201901483
- Waugh M., Briggs K., Gunn D., Gibeault M., King S., Ingram Q., Jimenez A.M., Berryman S., Lomovtsev D., Andrzejewski L., Tabard-Cossa V. (2020) Solid-state nanopore fabrication by automated controlled breakdown. *Nature Protocols*, **15**(1), 122–143. DOI: 10.1038/s41596-019-0255-2
- Tan S., Wang L., Liu H., Wu H., Liu Q. (2016) Single nanoparticle translocation through chemically modified solid nanopore. *Nanoscale Res. Lett.*, **11**, 1–10. DOI: 10.1186/s11671-016-1255-6
- Nam S.W., Rooks M.J., Kim K.B., Rossnagel S.M. (2009) Ionic field effect transistors with sub-10 nm multiple nanopores. *Nano Lett.*, **9**(5), 2044–2048. DOI: 10.1021/nl900309s
- Li J., Stein D., McMullan C., Branton D., Aziz M.J., Golovchenko J.A. (2001) Ion-beam sculpting at nanometre length scales. *Nature*, **412**(6843), 166–169. DOI: 10.1038/35084037

26. Kwok H., Briggs K., Tabard-Cossa V. (2014) Nanopore fabrication by controlled dielectric breakdown. *PLoS ONE*, **9**(3), e92880. DOI: 10.1371/journal.pone.0092880
27. Krainer F.W., Glieder A. (2015) An updated view on horseradish peroxidases: Recombinant production and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **99**(4), 1611–1625. DOI: 10.1007/s00253-014-6346-7
28. Rogozhin B.B., Kutuzova G.D., Ugarova N.N. (2000) Ингибирование пероксидазы хрена *N*-этиламидом *o*-сульфобензоилуксусной кислоты. *Биоорганическая химия*, **26**(2), 156–160. [Rogozhin V.V., Kutuzova G.D., Ugarova N.N. (2000) Inhibition of horseradish peroxidase by *N*-ethylamide of *o*-sulfobenzoylacetic acid. *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **26**, 138–141.] DOI: 10.1007/BF02759160
29. Davies P.F., Rennke H.G., Cotran R.S. (1979) Influence of molecular charge upon the endocytosis and intracellular fate of peroxidase activity in cultured arterial endothelium. *J. Cell Sci.*, **49**(1), 69–86. DOI: 10.1242/jcs.49.1.69
30. Welinder K.G. (1979) Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence, and some structural characteristics of horseradish peroxidase C. *Eur. J. Biochem.*, **96**, 483–502. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1979.tb13061.x
31. PyMOL. Retrieved January 16, 2024, from: <https://pymol.org/>
32. Zhu L., Gu D., Liu Q. (2017) Hydrogen peroxide sensing based on inner surfaces modification of solid-state nanopore. *Nanoscale Res. Lett.*, **12**, 1–10. DOI: 10.1186/s11671-017-2190-x
33. Tan S.W., Gu D.J., Liu H., Liu Q.J. (2016) Detection of a single enzyme molecule based on a solid-state nanopore sensor. *Nanotechnology*, **27**(15), 155502. DOI: 10.1088/0957-4484/27/15/155502
34. Sigma-Aldrich. Certificate of Analysis. Peroxidase from horseradish. Type VI-A, essentially salt-free, lyophilized powder, ≥ 250 units/mg solid (using pyrogallol), 950–2000 units/mg solid (using ABTS). Product Number P6782, Batch Number SLCK8071. Retrieved March 21, 2024, from: https://www.sigmaaldrich.com/certificates/COFA/P6/P6782/P6782-BULK____SLCK8071_.pdf
35. Berglund G.I., Carlsson G.H., Smith A.T., Szöke H., Henriksen A., Hajdu J. (2002) The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature*, **417**(6887), 463–468. DOI: 10.1038/417463a
36. Sanders S.A., Bray R.C., Smith A.T. (1994) pH-Dependent properties of a mutant horseradish peroxidase isoenzyme C in which Arg38 has been replaced with lysine. *Eur. J. Biochem.*, **224**, 1029–1037. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.01029.x
37. Merck. Enzymatic Assay of Peroxidase (EC 1.11.1.7) 2,2-Azino-Bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid) as a Substrate Sigma Prod. No. P-6782. Retrieved March 21, 2024, from: <https://www.sigmaaldrich.com/RU/en/technical-documents/protocol/protein-biology/enzymeactivity-assays/enzymatic-assay-of-peroxidase-abts-as-substrate>

Поступила: 25. 04. 2024.
После доработки 04. 07. 2024.
Принята к публикации: 22. 07. 2024.

REGISTRATION OF ACTIVITY OF A SINGLE MOLECULE OF HORSE RADISH PEROXIDASE USING A DETECTOR BASED ON A SOLID-STATE NANOPORE

Yu.D. Ivanov¹, A.N. Ableev¹, A.V. Vinogradova¹, E.D. Nevedrova¹, I.D. Shumov^{1}, V.S. Ziborov¹, A.F. Kozlov¹, I.A. Ivanova¹, N.V. Vaulin^{2,3}, D.V. Lebedev^{2,3}, A.S. Bukatin^{2,3}, I.S. Mukhin^{2,3}, E.A. Ponomarenko¹, A.I. Archakov¹*

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: shum230988@mail.ru

²Alferov University, 8 Khlopin str., Bldg. 3, St. Petersburg, 194021 Russia

³Institute for Analytical Instrumentation, 31-33 Ivan Chernykh str., St. Petersburg, 190103 Russia

This work demonstrates the use of a solid-state nanopore detector to monitor the activity of a single molecule of a model enzyme, horseradish peroxidase (HRP). This detector includes a measuring cell, which is divided into cis- and trans- chambers by a silicon nitride chip (SiN structure) with a nanopore of 5 nm in diameter. To entrap a single HRP molecule into the nanopore, an electrode had been placed into the cis-chamber; HRP solution was added into this chamber after application of a negative voltage. The reaction of the HRP substrate, 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS), oxidation by the enzyme molecule was performed in the presence of hydrogen peroxide. During this reaction, the functioning of a single HRP molecule, entrapped in the nanopore, was monitored by recording the time dependence of the ion current flowing through the nanopore. The approach proposed in our work is applicable for further studies of functioning of various enzymes at the level of single molecules, and this is an important step in the development of single-molecule enzymology.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: nanopore detector; enzymatic activity; nanopore; single molecule enzymology

Funding. The work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (No. 122030100168-2).

Received: 25.04.2024; revised: 04.07.2024; accepted: 22.07.2024.