

КОНСТРУИРОВАНИЕ НАДМОЛЕКУЛЯРНОЙ ИНДИКАТОРНОЙ СИСТЕМЫ «ЦЕЛЛЮЛОЗА – НАНОАЛМАЗ – УРЕАЗА»

E.D. Posokhina, N.O. Ronzhin,
A.V. Baron, V.S. Bondar

THE DESIGNING OF SUPRAMOLECULAR INDICATOR SYSTEM 'CELLULOSE – NANODIAMOND – UREASE'

Посохина Е.Д. – асп. базовой каф. биотехнологии Института фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, г. Красноярск. E-mail: katerina.p.93@mail.ru

Ронжин Н.О. – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаб. нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск. E-mail: roniol@mail.ru

Барон А.В. – канд. мед. наук, доц., ст. науч. сотр. лаб. нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск. E-mail: alexeybaron@mail.ru

Бондарь В.С. – д-р биол. наук, гл. науч. сотр., зав. лаб. нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск. E-mail: bondvs@mail.ru

Posokhina E.D. – Post-Graduate Student, Basic Chair of Biotechnology, Institute of Fundamental Biology and Biotechnology, Siberian Federal University, Krasnoyarsk. E-mail: katerina.p.93@mail.ru

Ronzhin N.O. – Cand. Biol. Sci., Junior Staff Scientist, Lab. of Nanobiotechnology and Bioluminescence, Institute of Biophysics SB RAS – Separate Division of FIC KSC SB RAS, Krasnoyarsk. E-mail: roniol@mail.ru

Baron A.V. – Cand. Med. Sci., Assoc. Prof., Senior Staff Scientist, Lab. of Nanobiotechnology and Bioluminescence, Institute of Biophysics SB RAS – Separate Division of FIC KSC SB RAS, Krasnoyarsk. E-mail: alexeybaron@mail.ru

Bondar V.S. – Dr. Biol. Sci., Prof., Chief Staff Scientist, Lab. of Nanobiotechnology and Bioluminescence, Institute of Biophysics SB RAS – Separate Division of FIC KSC SB RAS, Krasnoyarsk. E-mail: bondvs@mail.ru

Последовательной иммобилизацией компонентов сконструирована надмолекулярная индикаторная система биохимического определения мочевины: целлюлоза – наноалмаз – уреазы. Модифицированные наноалмазы (МНА) ковалентно иммобилизованы на полимерный носитель (гранулы ДЭАЭ-целлюлозы) с помощью реакции нуклеофильного присоединения. Установлено, что данная реакция, проводимая при весовом соотношении компонентов 4:1 (ДЭАЭ-целлюлоза : МНА), позволяет иммобилизовать до 110 мкг наночастиц на 1 мг полимера. Биомаркер (фермент уреазы) был иммобилизован с помощью ковалентной пришивки на полученный композит «полимер – МНА», поверхность которого была предварительно активирована бензохиноном. В сравнительных экспериментах фермент иммобилизовали на исходные гранулы полимера с помощью неспецифической адсорбции и ковалентной пришивки. Активность фермента в полученных надмолекулярных комплексах определяли уреазным салицилат-гипохлоритным методом по образованию окрашенного продукта, который оценивали спектрофотометрически. Показано, что молекулы уреазы могут быть иммобилизованы на гранулы ДЭАЭ-целлюлозы посредством адсорбции и ковалентной пришивки, проявляя после этого функциональную активность в обоих случаях. Однако было показано, что при многократном использовании этих индикаторных систем для тестирования аналита наблюдается заметная инактивация фермента, что сопровождается снижением выхода окрашенного продукта. В то же время в сравнительных экспериментах было установлено, что фермент, ковалентно иммобилизованный на композит «ДЭАЭ-целлюлоза – МНА», обладает большей функциональной эффективностью и обеспечивает более стабильный выход цветного продукта при многократном тестировании мочевины. Сравнительные исследования показали, что фермент, ковалентно при-

шитый на композит «ДЭАЭ-целлюлоза – МНА», обладает также большей термостабильностью и значительно медленнее теряет активность при многократном использовании индикаторной системы для тестирования мочевины при температуре 37 °С по сравнению с ферментом, ковалентно иммобилизованным на полимер. Результаты проведенных исследований открывают перспективы конструирования нового класса многократных систем индикации (надмолекулярных комплексов «полимерный носитель – наноалмаз – биомаркер») для биомедицинской аналитики.

Ключевые слова: наноалмаз, целлюлоза, уреазы, иммобилизация, надмолекулярный комплекс, индикаторная система.

A supramolecular indicator system (cellulose – nanodiamond – urease) for biochemical determination of urea was constructed by layer-by-layer immobilization of the components. Modified nanodiamonds (MND) were covalently immobilized on polymeric carrier (DEAE-cellulose granules) using nucleophilic addition reaction. It was established that during the reaction carried out at a weight ratio of components 4:1 (DEAE-cellulose : MND) up to 110 µg of the nanoparticles can be immobilized on 1 mg of the polymer. Biomarker (urease) was covalently immobilized on the surface of polymer-MND composite previously activated by benzoquinone. In comparative experiments the enzyme was immobilized on initial polymeric granules using nonspecific adsorption and covalent immobilization. The enzyme activity in obtained supramolecular complexes was assessed spectrophotometrically in the size of optical density of formed colored reaction product using urease salicylate-hypochlorite method. It was shown that urease molecules can be immobilized on DEAE-cellulose granules by adsorption and covalent immobilization, exhibiting their functional activity in both cases. However, it was shown that at reusable use of these indi-

cator systems for testing of analyte testing noticeable inactivation of enzyme that is followed by the decrease in an exit of painted product was observed. At the same time, in comparative experiments it was established that enzyme covalently immobilized on the DEAE-cellulose – MND composite had higher functional efficiency and enabled more stable yield of the colored product at multiple urea testing. Comparative studies showed that the enzyme covalently immobilized on the DEAE-cellulose – MND composite had also had higher thermal stability and more slowly lost its functional activity during multiple use of indicator system for urea testing at a temperature of 37°C, in comparison with enzyme immobilized in the same way on the polymer. The results of the study open the prospects for creation of a new class of reusable indicator systems (polymeric carrier – nanodiamond – biomarker supramolecular complexes) for biomedical analytics.

Keywords: nanodiamond, cellulose, urease, immobilization, supramolecular complex, indicator system.

Введение. Разработка и создание новых эффективных средств аналитики для биомедицинских приложений является одной из актуальных задач современной биотехнологии. Мировое научное сообщество активно изучает возможности конструирования систем индикации и диагностики посредством иммобилизации различных биомаркеров (прежде всего ферментов) на разные типы носителей. Общеизвестно, что индикаторные системы, создаваемые на основе ферментов, в значительном числе случаев обеспечивают высокую селективность и чувствительность детекции анализируемых веществ, обладают относительной простотой и быстротой анализа. Перспективными носителями для иммобилизации ферментных биомаркеров являются наночастицы разной физико-химической природы [1–6]. В частности, в качестве носителя ферментов привлекательным материалом могут являться модифицированные наноалмазы (МНА) взрывного синтеза, обладающие высокой коллоидной стабильностью в дисперсионных средах [7–10]. Физико-химические свойства МНА (прежде всего химически полиморфная, активная поверхность и возможности ее химической модификации) позволяют прогнозировать их применимость как материала биотехнологического и биомедицинского назначения [11]. Ранее мы показали применимость МНА для конструирования систем биохимической диагностики, адресной доставки лекарственных препаратов и новых средств антибактериального действия [4, 12, 13]. Была продемонстрирована пригодность полученных комплексов «МНА–ферменты» для биохимического тестирования физиологически важных аналитов [4]. В то же время следует сказать, что фиксация регистрирующего компонента (комплекс «наночастица–биомаркер») на твердой подложке (матрице, носителе) будет способствовать адаптации создаваемой индикаторной системы для практического применения в биологической и медицинской аналитике.

Цель работы. Экспериментальная оценка возможности конструирования надмолекулярной индикаторной системы «полимерный носитель – наноалмаз – биомаркер» на примере создания тест-системы биохимического определения мочевины.

Материалы и методы. В качестве полимерного носителя (подложки) в работе использовали гранулы ДЭАЭ (диэтиламиноэтил) целлюлозы (Pharmacia, Швеция). Для экспериментов полимерный носитель готовили следую-

щим образом. К навеске сухого препарата гранул ДЭАЭ-целлюлозы добавляли деионизованную (ДИ) воду, которую получали с помощью системы Milli-Q system (Millipore, США). Суспензию перемешивали и инкубировали в течение 12 часов при температуре 20–22 °С для набухания гранул полимера. После инкубации ДИ воду удаляли декантацией. Полученный осадок гранул полимера трижды промывали ДИ водой для удаления остатков консервантов, содержащихся в коммерческом препарате ДЭАЭ-целлюлозы. В исследованиях использовали МНА со средним размером кластеров в гидрозолях $d_{50} = 50$ нм, полученные из взрывных наноалмазов российского производства (ООО «Реал-Дзержинск», Россия) разработанным ранее способом [14]. Оценку распределения МНА по размерам кластеров в гидрозолях проводили на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Англия). В экспериментах использовали гидрозоль с концентрацией МНА 10 г/л, который готовили добавлением ДИ воды к навеске порошка наночастиц. В качестве модельного биомаркера в работе использовали фермент уреазу (карбамид-аминогидролаза, КФ 3.5.1.5) и реагенты для определения мочевины в сыворотке крови и моче из набора «Новокарб», поставляемого фирмой «Вектор-Бест» (Россия). Набор содержит калибратор мочевины (концентрация аналита 5 ммоль/л), буферный раствор уреазы и растворы химических реагентов (салицилат, нитропруссид, гипохлорит и гидроксид натрия). Для иммобилизации использовали водный раствор уреазы, который готовили предварительным диализом исходного ферментного препарата против ДИ воды ультрафильтрацией через мембрану с пределом исключения 30 кДа (система фирмы Amicon, США).

Надмолекулярный индикаторный комплекс «полимерный носитель – наноалмаз – биомаркер» конструировали последовательной иммобилизацией компонентов. Композит «ДЭАЭ-целлюлоза – МНА» получали с помощью реакции нуклеофильного присоединения [15]. Водную суспензию гранул целлюлозы смешивали с гидрозолям МНА при весовом соотношении компонентов 4:1 (полимер:наночастицы). К полученной смеси добавляли соляную кислоту («Реахим», Россия) до финальной концентрации 5 мМ и инкубировали смесь при температуре 20–22 °С в течение одного часа при постоянном перемешивании со скоростью 180 об/мин (Orbital Shaker OS-10, BIOSAN, Латвия). После этого полученный композит «полимер–наночастицы» собирали центрифугированием (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Германия) при 2300 г в течение 5 мин при температуре 20 °С. Осадок полимера многократно промывали (3 раза ДИ водой, 1 раз раствором 1 М NaCl, 3 раза ДИ водой) для удаления частиц МНА, не связавшихся с гранулами ДЭАЭ-целлюлозы. Для этого гранулы каждый раз ресуспендировали в свежем объеме промыточного раствора и собирали центрифугированием при указанных выше условиях. Супернатанты на всех стадиях (после реакции нуклеофильного присоединения и отмывок композита) отбирали для спектрального анализа (спектрофотометр UV-1800, Shimadzu, Япония) наличия МНА. Количество не связавшихся с полимером наночастиц рассчитывали из величин оптической плотности исходного гидрозоля МНА и супернатантов при длине волны 400 нм. Для количественной оценки использовали зависимость оптической плотности гидрозолей с известной концентрацией МНА, полученную ранее экспериментально [16].

Иммобилизацию уреазы на гранулы полимера проводили с помощью неспецифической адсорбции и ковалентной пришивки. На гранулы композита «ДЭАЭ-целлюлоза – МНА» фермент иммобилизовали ковалентно. При адсорбции фермента раствор уреазы добавляли к суспензии гранул полимера и инкубировали полученную смесь при температуре 20–22 °С в течение одного часа при постоянном перемешивании со скоростью 180 об/мин (Orbital Shaker OS-10). После этого гранулы полимера с адсорбированным ферментом собирали центрифугированием (Centrifuge 5415R) при условиях, указанных в предыдущем разделе. Осадки трижды отмывали ДИ водой для удаления остатков не связавшегося с гранулами фермента, каждый раз ресуспендируя их в свежей порции воды и собирая центрифугированием. Отмытые гранулы с адсорбированной уреазой ресуспендировали в ДИ воде и использовали в исследованиях. Ковалентную иммобилизацию уреазы проводили на гранулы полимера и композита, поверхность которых предварительно активировали бензохиноном по известной методике [17–19]. Это позволяет проводить последующую пришивку белков (в том числе ферментов) на активированном носителе в относительно мягких условиях, предотвращающих их денатурацию [19]. Активацию поверхности гранул целлюлозы и композита «ДЭАЭ-целлюлоза – МНА» бензохиноном и ковалентную пришивку уреазы проводили таким же образом, как это подробно изложено нами в предыдущих работах при создании на основе МНА и разных белков и ферментов систем адресной доставки биоактивных субстанций и биохимической диагностики [4, 12]. После ковалентной иммобилизации уреазы гранулы полимера и композита собирали центрифугированием и многократно промывали (3 раза 0,25 М NaCl, 1 раз ДИ водой) для удаления не связавшихся с носителем молекул фермента. Отмытые гранулы с ковалентно пришитой уреазой ресуспендировали в ДИ воде и использовали в экспериментах.

Активность фермента в составе сконструированных надмолекулярных комплексов оценивали уреазным салицилат-гипохлоритным методом [20], обеспечивающим образование цветного продукта при тестировании мочевины. Метод включает две стадии – ферментативную и неферментативную (химическую). На первой стадии мочевина гидролизует уреазой с образованием аммиака, который в ходе второй стадии взаимодействует в щелочных условиях с химическими компонентами реакционной смеси, что сопровождается образованием окрашенного продукта. При использовании данного метода в нашей работе мы разделили ферментативную и неферментативную стадии. Это позволило устранить инактивацию иммобилизованного фермента под действием химических реагентов (прежде всего гипохлорита и гидроокиси натрия) и многократно использовать индикаторные комплексы для тестирования аналита. В предварительных экспериментах было установлено, что уже однократное проведение обеих реакций в присутствии индикаторных комплексов полностью инактивирует иммобилизованный фермент. При оценке уреазной активности реакционная смесь общим объемом 250 мкл включала: 150 мкл ДИ воды, 100 мкл водной суспензии изучаемого индикаторного комплекса (концентрация полимера в пробе 16 мг/мл) и 5 мкл калибратора мочевины (концентрация аналита в пробе 0,1 ммоль/л). После добавки всех компонентов образцы перемешивали и инкубировали в течение 5 мин

при температуре 20–22 °С, после чего комплексы собирали центрифугированием. Супернатанты отбирали и добавляли растворы, необходимых для проведения неферментативной стадии химических реагентов, которые готовили *in situ* в ДИ воде в соответствии с регламентом фирмы «Вектор-Бест». После перемешивания образцы инкубировали в течение 5 мин при указанной выше температуре. Количество образовавшегося окрашенного продукта оценивали спектрофотометрически (UV-1800) по величине оптической плотности образцов при длине волны 700 нм. При многократном использовании индикаторных комплексов, после проведения ферментативной реакции, их собирали центрифугированием. Супернатанты отбирали для проведения химической реакции и спектральной оценки образовавшегося окрашенного продукта. Полученные осадки дважды промывали (1 раз 125 мМ NaCl и 1 раз ДИ водой) для удаления остатков субстрата (мочевина) и продукта (аммиак) ферментативной реакции. Отмытые комплексы ресуспендировали в ДИ воде и добавкой аналита вновь запускали ферментативную реакцию. Термостабильность фермента при многократном использовании индикаторных комплексов оценивали инкубацией образцов при 37 °С в термостате (Thermo bath TB-85, Shimadzu, Япония) при проведении ферментативной реакции.

Результаты и их обсуждение. Для получения композита «ДЭАЭ-целлюлоза – МНА» нами была использована реакция нуклеофильного присоединения. Целесообразность ее применения определялась следующими причинами. Известно [15], что реакции присоединения по наиболее распространенному бимолекулярному механизму $A_{AC}2$ (присоединение по C=O связи) проходят в две стадии, где нуклеофилами могут являться: OH, R²O, NH₂, R²NH, R²CH и т.п. Показано, что на поверхности МНА обнаруживается значительный спектр кислородсодержащих групп, включая карбонильные [9]. Общеизвестно, что целлюлоза представляет собой гомополимер из остатков D-глюкозы и содержит в своей структуре большое количество гидроксильных групп [21]. Кроме того, в структуре ДЭАЭ-целлюлозы имеются дополнительные участки R²NH. Поскольку реакции присоединения с кислородными нуклеофилами катализируются кислотами за счет протонирования атома кислорода карбонила с образованием высоконуклеофильного карбокатиона [15], композит «ДЭАЭ-целлюлоза – МНА» получали инкубацией компонентов в ДИ воде, содержащей 5 мМ HCl.

В ходе проведенных экспериментов было установлено, что реакция нуклеофильного присоединения позволяет получить композит «ДЭАЭ-целлюлоза – МНА», что подтверждалось изменением внешнего вида гранул полимера после проведения реакции (рис. 1). Видно, что молочного цвета исходные гранулы полимера приобретают коричневый цвет за счет связавшихся с ними частиц МНА. Расчеты, проведенные на основании данных спектрального анализа исходного гидрозоля МНА и супернатантов после получения композита и его отмывки, показали, что при выбранных условиях эксперимента (соотношение компонентов, скорость перемешивания суспензии, время и температура инкубации) на 1 мг полимерного носителя с помощью реакции нуклеофильного присоединения можно ковалентно иммобилизовать до 110 мкг наночастиц.

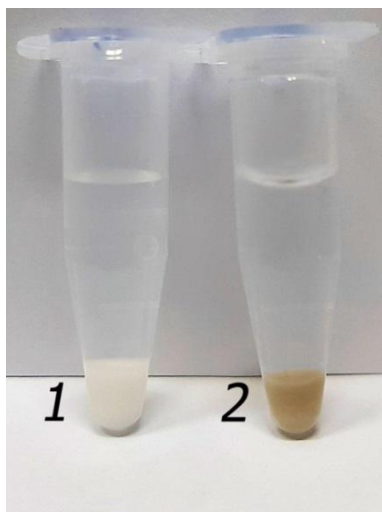


Рис. 1. Внешний вид гранул ДЭАЭ-целлюлозы: 1 – исходные гранулы полимера; 2 – гранулы полимера после проведения реакции нуклеофильного присоединения (композит «полимер – МНА»)

Как показали исследования (рис. 2), молекулы уреазы могут быть иммобилизованы на гранулы ДЭАЭ-целлюлозы посредством адсорбции и ковалентной пришивки, проявляя в обоих случаях функциональную активность. Однако из представленных данных видно, что при многократном использовании полученных индикаторных комплексов для тестирования аналита даже при температуре 20–22 °С наблюдается заметная инактивация иммобилизованного фермента, что подтверждается снижением выхода продукта реакции. Мы предполагаем, что это может происходить за счет деградации части молекул фермента в ходе многократного осаждения комплексов цен-

трифугированием и их ресуспендирования при многократных отмытках от остатков субстрата и продукта реакции. В то же время в сравнительных экспериментах было установлено, что фермент, ковалентно иммобилизованный на композит «ДЭАЭ-целлюлоза – МНА», обладает большей функциональной эффективностью и обеспечивает более стабильный выход цветного продукта при многократном тестировании мочевины (рис. 2). Это дает основание предполагать, что фермент, ковалентно иммобилизованный на частицы МНА композита, обладает большей резистентностью к воздействию повреждающих факторов.

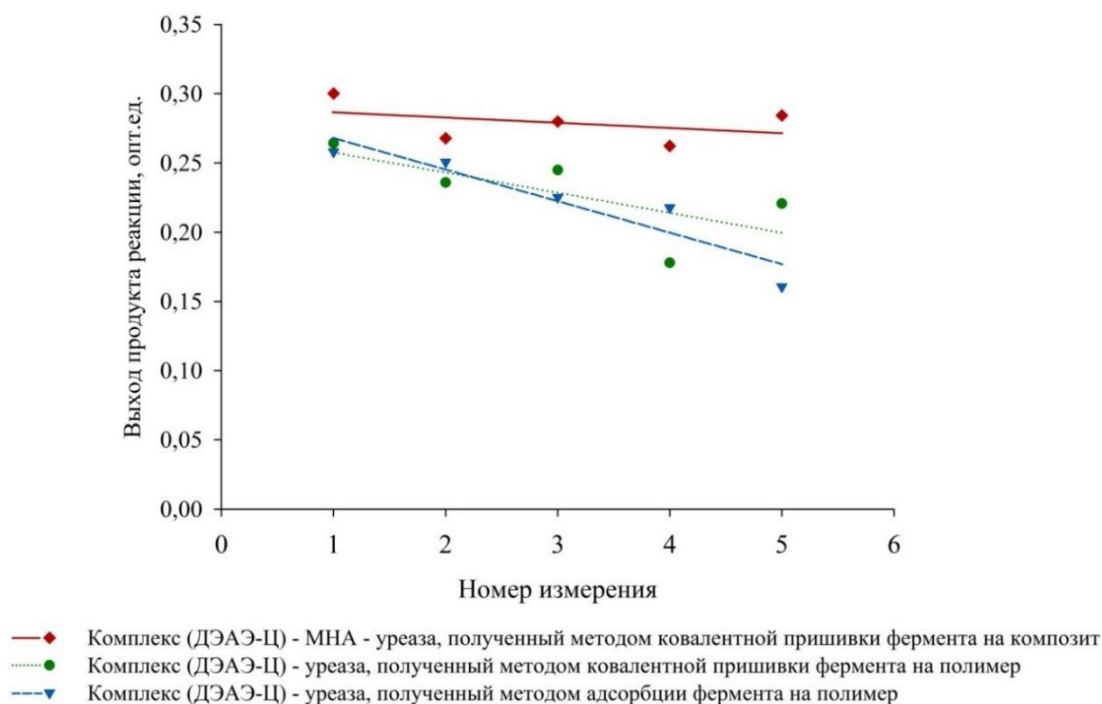


Рис. 2. Выход продукта реакции при многократном использовании сконструированных надмолекулярных систем индикации для тестирования аналита при температуре 20–22 °С

В пользу высказанного выше предположения могут свидетельствовать и результаты сравнительных экспериментов по многократному использованию сконструированных индикаторных комплексов «целлюлоза – уреазы» и «целлюлоза – наноалмаз – уреазы» для тестирования мочевины при температуре 37 °С (рис. 3). Из представленных данных видно, что фермент, ковалентно приши-

тый на композит «ДЭАЭ – целлюлоза – МНА», значительно более стабилен к воздействию температурного фактора и гораздо медленнее утрачивает функциональную активность по сравнению с ферментом, ковалентно иммобилизованным на гранулы полимера. Это следует из значений выхода окрашенного продукта реакции при многократном тестировании аналита (рис. 3).

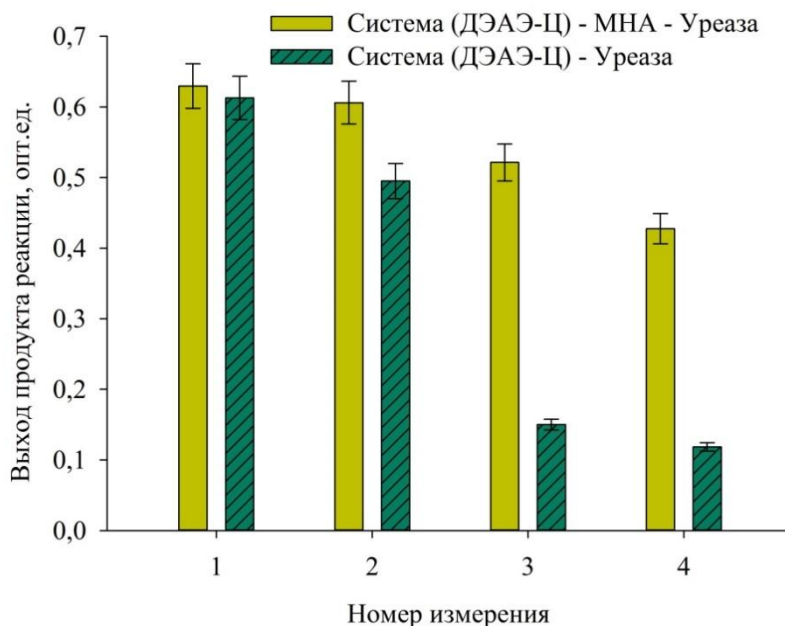


Рис. 3. Выход продукта реакции при многократном использовании индикаторных комплексов, полученных при ковалентной иммобилизации фермента, для тестирования аналита при 37 °С

Заключение. Таким образом, на примере создания тест-системы биохимического определения мочевины продемонстрирована возможность конструирования надмолекулярных систем индикации «полимер – наноалмаз – биомаркер». В сравнительных исследованиях установлено, что индикаторный комплекс, полученный при ковалентной пришивке уреазы на композит «ДЭАЭ-целлюлоза – МНА», обладает наибольшей эффективностью и обеспечивает более стабильный выход цветного продукта при многократном тестировании аналита. Установлено, что фермент, ковалентно иммобилизованный на частицы МНА композита, обладает большей резистентностью к воздействию повреждающих факторов и большей термостабильностью. Полученные данные открывают перспективы создания нового класса многоцветных тест-систем индикации (надмолекулярных комплексов «полимерный носитель – наноалмаз – биомаркер») для биологической и медицинской аналитики. Оптимизация условий конструирования надмолекулярных индикаторных комплексов (в том числе на двумерной полимерной подложке и 3D полимерных конструкциях) с целью увеличения их эффективности и адаптации полученных тест-систем для практических приложений является предметом дальнейших исследований.

Литература

1. Artilles M., Rout C.S., Fisher T.S. Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2011. – V. 63. – P. 1352–1360.
2. Fisher P., Fadley C.S. Probing nanoscale behavior of magnetic materials with soft X-ray spectroscopy // *Nanotech. Rev.* – 2012. – V. 1. – P. 5–15.
3. Lad A., Agrawal Y.K. Nanodevices for monitoring toxicological behavior of therapeutic agent // *Rev. Nanosci. Nanotech.* – 2012. – V. 1. – P. 217–227.
4. Nanodiamond-based tests systems for biochemical determination of glucose and cholesterol / N.O. Ronzhin, A.V. Baron, E.S. Mamaeva [et al.] // *J. Biomater. Nanobiotech.* – 2013. – V. 4. – P. 242–246.
5. Yin M., Zhao L., Wei Q., Li H. Rapid colorimetric detection of melamine by H₂O₂-Au nanoparticles // *RSC Adv.* – 2015. – V. 5. – P. 32897–32901.
6. Wang Y., Hu S. Applications of carbon nanotubes and graphene for electrochemical sensing of environmental pollutants // *J. Nanosci. Nanotech.* – 2016. – V. 16. – P. 7852–7872.
7. Bondar V.S., Puzyr A.P. Nanodiamonds for biological investigations // *Phys. Solid State.* – 2004. – V. 46. – P. 716–719.
8. Physical and chemical properties of modified nanodiamonds / A.P. Puzyr, V.S. Bondar, A.A. Bukayemsky [et al.] // *NATO Sci. Ser. II: Math. Phys. Chem.* – 2005. – V. 192. – P. 261–270.

9. Colloidal stability of modified nanodiamond particles / *N. Gibson, O. Shenderova, T.J.M. Luo* [et al.] // *Diam. Relat. Mater.* – 2009. – V. 18. – P. 620–626.
10. *Puzyr A.P., Burov A.E., Bondar V.S.* Modification and comparative study of commercial nanodiamonds // *Full. Nanotub. Carb. Nanostr.* – 2015 – V. 23. – P. 93–97.
11. Nanodiamonds with novel properties: a biological study / *A.P. Puzyr, A.V. Baron, K.V. Purtov* [et al.] // *Diam. Relat. Mater.* – 2007. – V. 16. – P. 2124–2128.
12. Nanodiamonds as carriers for address delivery of biologically active substances / *K.V. Purtov, A.I. Petunin, A.E. Burov* [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* – 2010. – V. 5. – P. 631–636.
13. Оценка активности лизоцима после его ковалентной иммобилизации на наноалмазы детонационного синтеза / *Н.О. Ронжин, Е.Д. Посохина, А.В. Барон* [и др.] // *Вестн. КрасГАУ.* – 2016. – № 8. – С. 38–44.
14. *Puzyr A.P., Bondar V.S.* Method of production of nanodiamonds of explosive synthesis with an increased colloidal stability // RU Patent No. 2252192. – 2005, Bull. № 14.
15. *Марч Д.* Органическая химия: реакции, механизмы и структура. – М.: Мир, 1988. – Т.3. – 456 с.
16. Конструирование композиционных материалов на основе наноалмазов и разрушаемых биополимеров / *В.С. Бондарь, А.П. Пузырь, А.В. Горева* [и др.] // *Журнал Сибирского федерального университета. Биология.* – 2013. – Т. 6. – № 2. – С. 163–174.
17. *Brandt J., Andersson L.O., Porath J.* Covalent attachment of proteins to polysaccharide carriers by means of benzoquinone // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1975. – V. 386. – P. 196–202.
18. Ready to use p-benzoquinone-activated supports for biochemical coupling, with special applications for laccase immobilization / *M.-A. Mateescu, G. Weltrowska, E. Agostinelli* [et al.] // *Biotechnol. Tech.* – 1989. – V. 3. – P. 415–420.
19. *Остерман Л.А.* Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985. – 536 с.
20. *Яковлева Г.Е.* Ферменты в клинической биохимии: пособие для врачей. – Новосибирск: Вектор-Бест, 2005. – С. 28–29.
21. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material / *D. Klemm, B. Heublein, H.P. Fink* [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2005. – V. 44. – P. 3358–3393.
5. *Yin M., Zhao L., Wei Q., Li H.* Rapid colorimetric detection of melamine by H₂O₂-Au nanoparticles // *RSC Adv.* – 2015. – V. 5. – P. 32897–32901.
6. *Wang Y., Hu S.* Applications of carbon nanotubes and graphene for electrochemical sensing of environmental pollutants // *J. Nanosci. Nanotech.* – 2016. – V. 16. – P. 7852–7872.
7. *Bondar V.S., Puzyr A.P.* Nanodiamonds for biological investigations // *Phys. Solid State.* – 2004. – V. 46. – P. 716–719.
8. Physical and chemical properties of modified nanodiamonds / *A.P. Puzyr, V.S. Bondar, A.A. Bukayemsky* [et al.] // *NATO Sci. Ser. II: Math. Phys. Chem.* – 2005. – V. 192. – P. 261–270.
9. Colloidal stability of modified nanodiamond particles / *N. Gibson, O. Shenderova, T.J.M. Luo* [et al.] // *Diam. Relat. Mater.* – 2009. – V. 18. – P. 620–626.
10. *Puzyr A.P., Burov A.E., Bondar V.S.* Modification and comparative study of commercial nanodiamonds // *Full. Nanotub. Carb. Nanostr.* – 2015 – V. 23. – P. 93–97.
11. Nanodiamonds with novel properties: a biological study / *A.P. Puzyr, A.V. Baron, K.V. Purtov* [et al.] // *Diam. Relat. Mater.* – 2007. – V. 16. – P. 2124–2128.
12. Nanodiamonds as carriers for address delivery of biologically active substances / *K.V. Purtov, A.I. Petunin, A.E. Burov* [et al.] // *Nanoscale Res. Lett.* – 2010. – V. 5. – P. 631–636.
13. Ocenka aktivnosti lizocima posle ego kovalentnoj immobilizacii na nanoalmazy detonacionnog sinteza / *N.O. Ronzhin, E.D. Posohina, A.V. Baron* [i dr.] // *Vestn. KrasGAU.* – 2016. – № 8. – S. 38–44.
14. *Puzyr A.P., Bondar V.S.* Method of production of nanodiamonds of explosive synthesis with an increased colloidal stability // RU Patent No. 2252192. – 2005, Bull. № 14.
15. *March D.* Organicheskaja himija: reakcii, mehanizmy i struktura. – М.: Mir, 1988. – Т.3. – 456 s.
16. Konstruirovanie kompozicionnyh materialov na osnove nanoalmazov i razrushaemyh biopolimerov / *V.S. Bondar', A.P. Puzyr', A.V. Goreva* [i dr.] // *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Biologija.* – 2013. – Т. 6. – № 2. – S. 163–174.
17. *Brandt J., Andersson L.O., Porath J.* Covalent attachment of proteins to polysaccharide carriers by means of benzoquinone // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1975. – V. 386. – P. 196–202.
18. Ready to use p-benzoquinone-activated supports for biochemical coupling, with special applications for laccase immobilization / *M.-A. Mateescu, G. Weltrowska, E. Agostinelli* [et al.] // *Biotechnol. Tech.* – 1989. – V. 3. – P. 415–420.
19. *Osterman L.A.* Hromatografija belkov i nukleinovyh kislot. – М.: Nauka, 1985. – 536 s.
20. *Jakovleva G.E.* Fermenty v klinicheskoj biohimii: posobie dlja vrachej. – Novosibirsk: Vektor-Best, 2005. – S. 28–29.
21. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material / *D. Klemm, B. Heublein, H.P. Fink* [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed.* – 2005. – V. 44. – P. 3358–3393.

Literatura

1. *Artiles M., Rout C.S., Fisher T.S.* Graphene-based hybrid materials and devices for biosensing // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2011. – V. 63. – P. 1352–1360.
2. *Fisher P., Fadley C.S.* Probing nanoscale behavior of magnetic materials with soft X-ray spectroscopy // *Nanotech. Rev.* – 2012. – V. 1. – P. 5–15.
3. *Lad A., Agrawal Y.K.* Nanodevices for monitoring toxicological behavior of therapeutic agent // *Rev. Nanosci. Nanotech.* – 2012. – V. 1. – P. 217–227.
4. Nanodiamond-based tests systems for biochemical determination of glucose and cholesterol / *N.O. Ronzhin, A.V. Baron, E.S. Mamaeva* [et al.] // *J. Biomater. Nanobiotech.* – 2013. – V. 4. – P. 242–246.