



Получено: 8.02.2023 г. | Принято: 15.02.2023 г. | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.2.106.113>

Научная статья

АСМ-ИССЛЕДОВАНИЕ ПОСТ-ЭФФЕКТА ДВИЖЕНИЯ ГЛИЦЕРИНА В ВЫХОДНОЙ ЧАСТИ ПРОТОЧНОЙ АНАЛИТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ НА АДсорбЦИОННЫЕ СВОЙСТВА БЕЛКА

Ю.Д.Иванов^{1, 2}, д.б.н., проф., зав. лаб., ORCID: 0000-0001-5041-1914 / yurii.ivanov.nata@gmail.com

И.Д.Шумов¹, к.б.н., науч. сотр., ORCID: 0000-0002-9795-7065

А.Ф.Козлов¹, вед. инж., ORCID: 0000-0002-2117-8743

М.О.Ершова¹, мл. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-2493-6933

А.А.Валуева¹, мл. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-6749-9577

И.А.Иванова¹, мл. науч. сотр., ORCID: 0000-0002-2103-2998

В.Ю.Татур³, исполнительный директор, ORCID: 0000-0002-6415-5189

А.А.Лукьяница³, д.т.н., руководитель отдела, ORCID: 0000-0002-0517-0602

Н.Д.Иванова⁴, преподаватель, ORCID: 0000-0001-5942-8050

Е.Д.Неведрова⁴, студент, ORCID: 0000-0003-2767-2299

В.С.Зиборов^{1, 2}, к.ф.-м.н., ст. науч. сотр., ORCID: 0000-0001-7942-3337

Аннотация. Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) исследован пост-эффект движения глицерина по спиральной проточной системе на адсорбционные свойства белка пероксидазы хрена (ПХ), инкубированного вблизи линейной части выходной части проточной системы.

Ключевые слова: пероксидаза хрена, атомно-силовая микроскопия, спиральная коммуникация, адсорбция белка

Для цитирования: Ю.Д. Иванов, И.Д. Шумов, А.Ф. Козлов, М.О. Ершова, А.А. Валуева, И.А. Иванова, В.Ю. Татур, А.А. Лукьяница, Н.Д. Иванова, Е.Д. Неведрова, В.С. Зиборов. АСМ-исследование пост-эффекта движения глицерина в выходной части проточной аналитической системы на адсорбционные свойства белка. НАНОИНДУСТРИЯ. 2023. Т. 16, № 2. С. 106-113. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.2.106.113>

Received: 8.02.2023 | Accepted: 15.02.2023 | DOI: <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.2.106.113>

Original paper

AFM STUDY OF THE POST-EFFECT OF GLYCEROL FLOW IN AN OUTPUT SECTION OF A FLOW-BASED ANALYTICAL SYSTEM ON ADSORPTION PROPERTIES OF A PROTEIN

Yu.D.Ivanov^{1, 2}, Doct. of Sci. (Biology), Prof., Head of Laboratory, ORCID: 0000-0001-5041-1914 / yurii.ivanov.nata@gmail.com

I.D.Shumov¹, Cand. of Sci. (Biology), Researcher, ORCID: 0000-0002-9795-7065

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича", Москва, Россия / Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Объединенный институт высоких температур Российской академии наук, Москва, Россия / Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Фонд перспективных технологий и новаций, Москва, Россия / Foundation of Perspective Technologies and Novations, Moscow, Russia

⁴ Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И.Скрябина, Москва, Россия / Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology Named after Skryabin, Moscow, Russia



A.F.Kozlov¹, Leading Engineer, ORCID: 0000-0002-2117-8743

M.O.Ershova¹, Junior Researcher, ORCID: 0000-0002-2493-6933

A.A.Valueva¹, Junior Researcher, ORCID: 0000-0002-6749-9577

I.A.Ivanova¹, Junior Researcher, ORCID: 0000-0002-2103-2998

V.Yu.Tatur³, Executive Director, ORCID: 0000-0002-6415-5189

A.A.Lukyanitsa³, Doct. of Sci. (Tech), Head of Department, ORCID: 0000-0002-0517-0602

N.D.Ivanova⁴, Instructor, ORCID: 0000-0001-5942-8050

E.D.Nevedrova⁴, Student, ORCID: 0000-0003-2767-2299

V.S.Ziborov^{1, 2}, Cand. of Sci. (Physics and Mathematics), Senior Researcher, ORCID: 0000-0001-7942-3337

Abstract. Atomic force microscopy (AFM) has been used to study the post-effect of glycerol flow through a spiral-wound flow-based system on adsorption properties of horseradish peroxidase (HRP) protein, which was incubated near the linear part of the outlet section of the flow-based system.

Keywords: horseradish peroxidase, atomic force microscopy, spiral-wound communication, protein adsorption

For citation: Yu.D. Ivanov, I.D. Shumov, A.F. Kozlov, M.O. Ershova, A.A. Valueva, I.A. Ivanova, V.Yu. Tatur, A.A. Lukyanitsa, N.D. Ivanova, E.D. Nevedrova, V.S. Ziborov. AFM-study of the post-effect of glycerol flow in an output section of a flow-based analytical system on adsorption properties of a protein. NANOINDUSTRY. 2023. V. 16, no. 2. PP. 106-113. <https://doi.org/10.22184/1993-8578.2023.16.2.106.113>.

ВВЕДЕНИЕ

Спиральные коммуникации часто используются в системах термостабилизации биосенсоров и биореакторов в качестве теплообменников [1]. Подводящие к ним коммуникации часто бывают выполнены из полимерных материалов для обеспечения гибкости подводки теплоносителя. Среди теплоносителей, которые могут использоваться для термостабилизации в широком диапазоне температур от отрицательных до положительных, который обычно реализуется в полевых условиях, перспективным является использование глицерина [2]. Глицерин является простейшим представителем трехатомных спиртов и представляет собой вязкую прозрачную жидкость со сладким вкусом. При этом глицерин нетоксичен, в отличие от этиленгликоля [3]. Соответственно, в инструментарии современных аналитических систем, в том числе биосенсоров, жидкие теплоносители на основе глицерина могут использоваться в системах термостабилизации измерительных ячеек в широком диапазоне температур. При движении глицерина или водных сред вдоль поверхности наблюдается трибоэлектрический эффект - разделение зарядов. Возникновение трибоэлектрического эффекта при движении водных и неводных сред вдоль твердых поверхностей широко обсуждалось в литературе [4-7]. Соответственно, в них возникает электромагнитное поле. Влияние такого поля может распространяться и за пределы этой коммуникации [8].

Ранее нами было показано, что при размещении раствора ПХ в подобной спиральной системе, которая была заключена в заземленный металлический экран (для экранирования электромагнитного поля от спиральной конструкции), в положении вблизи линейной неэкранированной незаземленной части, выходящей из спирали наблюдалась повышенная адсорбция ПХ на поверхности АСМ-подложки из слюды [8], а также и понижение ее активности. Наша же представленная здесь работа посвящена исследованию влияния пост-эффекта (возникающего после остановки потока глицерина в спиральной проточной системе) на свойства белка, размещенного вблизи той же ее линейной части на выходе из спиральной конструкции.

В представленной работе исследовано влияние пост-эффекта после остановки потока глицерина на свойства белка ПХ, раствор которого был размещен около линейного участка выхода потока ("выход"). Для того чтобы исключить предполагаемое влияние электромагнитного поля от спиральной части системы, она в этом случае была экранирована металлическим заземленным экраном.

ПХ выбрана в нашей работе в качестве объекта исследования, так как этот гликопротеин часто используется как модель при исследованиях широкого класса пероксидаз и является хорошо охарактеризованным и использованным в практике ферментом [9-17]. ПХ катализирует окисление широкого спектра органических и неорганических

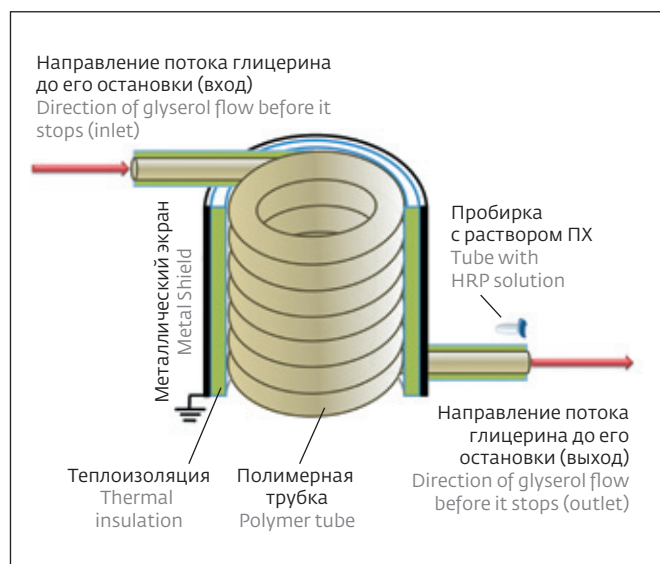


Рис.1. Схема экспериментальной установки для исследования пост-эффекта потока глицерина на свойства белка. Полимерная трубка была спирально навита на стеклянный цилиндр. Через трубку прокачивали глицерин (объемный расход 9 л/с). После остановки потока глицерина пробирку с раствором ПХ располагали вблизи линейного выходного участка спиральной коммуникации. Спиральную часть системы экранировали заземленным металлическим экраном

Fig.1. Schematic of the experimental setup for used for studying the post-effect of glycerol flow on protein properties. The polymer pipe was spirally wound on a glass cylinder. Glycerol was pumped through the pipe (volume flow 9 L/s). After stopping the glycerol flow, the test tube with the HRP solution was placed near the linear output section of the spiral communication. The spiral section of the system was covered with a grounded metal shield

соединений [18]. Молекулярная масса ПХ составляет 40–44 кДа [19, 20].

Для исследования влияния пост-эффекта движения глицерина на адсорбцию и агрегацию ПХ в нашей работе использовался метод атомно-силовой микроскопии (АСМ), который позволяет проводить визуализацию на уровне единичных молекул белка. Оценка ферментативной активности ПХ проводилась стандартным спектрофотометрическим методом.

Было показано, что после выключения потока глицерина через спиральную коммуникацию наблюдается влияние на повышение агрегации ПХ, расположенного на поверхности слюдяного АСМ-чипа, вблизи линейной выходной части спиральной конструкции. Полученные результаты следует учитывать при анализе белков и их комплексов в проточных аналитических системах. Также эти данные полезны для моделирования

гемодинамики в организме при патологических изменениях, связанных с внезапной остановкой сердца и другими патологическими изменениями, связанными с кровообращением в организме.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали белок ПХ из корневой хрена (Sigma, Cat. #6782). 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) (АБТС) был приобретен в Sigma (Cat. #A-1888). Перекись водорода (H_2O_2 , ч.д.а.), лимонная кислота (ос.ч.) и однозамещенный фосфат натрия (Na_2HPO_4 , ч.д.а.) были приобретены в Реахим (Москва). 2 мМ фосфатно-солевой буфер (модификация Дульбекко, ФСБ-Д) был приготовлен путем растворения готовой смеси (Pierce, США) в ультрачистой воде. Все растворы были приготовлены с использованием деионизированной ультрачистой воды ($18,2 M\Omega \times cm$), полученной с помощью установки Simplicity UV (Millipore, Франция). Глицерин был приобретен в Glasconchemic GmbH (Германия).

Экспериментальная схема представлена на рис.1. Проточная часть тремостабилизирующей аналитической системы имитировалась спирально навитой полимерной трубкой. Спиральная конструкция была экранирована металлическим заземленным экраном для экранировки электромагнитного поля, которое может возникнуть от спиральной конструкции. Расстояние от пробирки, расположенной на линейном выходе спирали, до спирали составляло 20 см. Пробирка не касалась коммуникации, то есть была подвешена над линейной выходной частью на расстоянии 1 см. В качестве измерительной ячейки использовалась пробирка типа Эппендорф, в которую помещали 1 мл раствора белка, и размещали в системе в положении, указанном на рис.1.

В экспериментах использовали 0,1 мкМ ($10^{-7} M$) раствор ПХ в 2 мМ ФСБ-Д (pH 7,4). Перед проведением эксперимента по исследованию пост-эффекта потока глицерина на ПХ по проточной системе прокачивали глицерин, с объемным расходом 9 л/с при температуре 65 °С. Спиральная коммуникация была теплоизолирована полимерным экраном для того, чтобы исключить нагрев исследуемого раствора ПХ. Таким образом, раствор ПХ в экспериментах находился при комнатной температуре. Нагрев глицерина требовался для того, чтобы обеспечить необходимый объемный расход глицерина при его прокачке по спиральной коммуникации в связи с тем, что он имеет высокую вязкость при комнатной температуре. Непосредственно перед проведением эксперимента поток глицерина останавливали.



Пробирку с раствором ПХ размещали вблизи выходного участка линейной части коммуникации после остановки потока глицерина и выдерживали в течение 40 мин (так называемый режим "пост-движения"). После этого раствор ПХ передавали на анализ методами АСМ и спектрофотометрии. В контрольных экспериментах пробирку с раствором ПХ помещали вдали (на расстоянии 10 м) от установки и выдерживали также в течение 40 мин. Далее проводили АСМ и спектрофотометрические измерения, как и в рабочих экспериментах.

Исходный 0,1 мкМ раствор ПХ в 2 мМ буфере ФСБ-Д помещали в стандартные пробирки типа Эппендорф объемом 1,7 мл (SSI Bio, США). Для исследования этих образцов методом АСМ использовали метод непосредственной адсорбции [8, 21]. В пробирки помещали подложки из свежесколотой слюды сорта мусковит (SPI, США) размером 7,5×15 мм и инкубировали в течение 10 мин при 600 об/мин и комнатной температуре в лабораторном встряхивателе Thermomixer Comfort (Eppendorf, Германия). После инкубации каждую слюдяную подложку с адсорбированной ПХ промывали свежей сверхчистой водой и сушили на воздухе. Для каждого образца ПХ эксперименты проводили не менее трех раз.

Поверхность подложек для АСМ – свежесколотой слюды сорта мусковит размером 7×15 мм с адсорбированными молекулами ПХ – визуализировали методом АСМ в полуконтактном режиме на воздухе при температуре 25 °С с помощью атомно-силового микроскопа Titanium (NT-MDT, Москва, Зеленоград, Россия; атомно-силовой микроскоп относится к оборудованию ЦКП "Протеом человека" ИБМХ, поддержанного Минобрнауки России в рамках выполнения Соглашения № 14.621.21.0017, уникальный идентификатор работ RFMEFI62117X0017) с кантилеверами NSG10 (TipsNano, Зеленоград, Россия; резонансная частота от 47 до 150 кГц; силовая постоянная от 0,35 до 6,1 Н/м). Площадь скана составляла 1×1 мкм² или 2×2 мкм² (256×256 точек). Для каждой подложки получали не менее 16 сканов в разных участках ее поверхности. Калибровку микроскопа по высоте проводили по калибровочной решетке TGZ1 (NT-MDT, Россия, высота шага 21,4±1,5 нм).

Общее число объектов, визуализированных на АСМ-изображениях для каждого образца, составляло не менее 200 шт. Функции распределения относительного количества объектов по высотам $\rho(h)$ рассчитывали по формуле:

$$\rho(h) = (N_h/N) \times 100\%, \quad (1)$$

где N_h – количество объектов с высотой h , а N – общее количество АСМ-визуализированных объектов [22]. Холостые опыты для оценки числа неспецифических объектов на поверхности подложки были проведены с использованием чистого буферного раствора, не содержащего белок; в холостых опытах не было зарегистрировано объектов с высотами, превышающими 0,5 нм.

АСМ-сканирование и дальнейшую обработку полученных АСМ-изображений (выравнивание, коррекция, экспорт в формат ASCII и т.д.) проводили при использовании стандартного ПО NOVA Rx (NT-MDT, Москва, Зеленоград, Россия). Число частиц, визуализированных в АСМ-измерениях, определяли с помощью программного обеспечения, разработанного для ИБМХ (В.Ю.Татуром, А.А.Лукияницей, Ю.Д.Ивановым).

Ферментативную активность ПХ в отношении ее субстрата АБТС оценивали методом спектрофотометрии в соответствии с методикой, описанной Sanders *et al.* [23]. Вкратце, зависимости поглощения $A_{405}(t)$ 1 нМ (10^{-9} М) раствора ПХ в фосфатно-цитратном буфере (51 мМ Na_2HPO_4 , 24 мМ лимонной кислоты, рН 5) от времени регистрировали при длине волны 405 нм в течение 5 мин на спектрофотометре 8453 (Agilent Deutschland GmbH, Вальдбронн, Германия) следующим образом. Аликвоту 30 мкл 0,1 мкМ (10^{-7} М) раствора ПХ добавляли к 2,95 мкл буфера в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см (Agilent Deutschland GmbH, Вальдбронн, Германия) и тщательно перемешивали. Затем в ячейку добавляли 8 мкл 3% (масс./масс.) раствора перекиси водорода и сразу же начинали регистрацию спектра.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Как было сказано ранее, нами были получены АСМ-данные об адсорбционных свойствах ПХ на поверхности АСМ-чипа на выходе линейной части спиральной коммуникации в режиме "во время движения" глицерина [8]. В продолжение этой работы, но уже для условий измерения адсорбционных свойств ПХ в режиме "пост-движения" глицерина, мы провели АСМ-измерения адсорбционных свойств ПХ. Для этого были проведены АСМ-измерения высот адсорбированных объектов на АСМ-чипе после того, как раствор ПХ инкубировали вблизи коммуникации после выключения потока глицерина.

Пример АСМ-изображений, полученных для ПХ в экспериментах в режиме "пост-движения" глицерина, приведен на рис.2. Приведено типичное изображение поверхности свежесколотой слюды

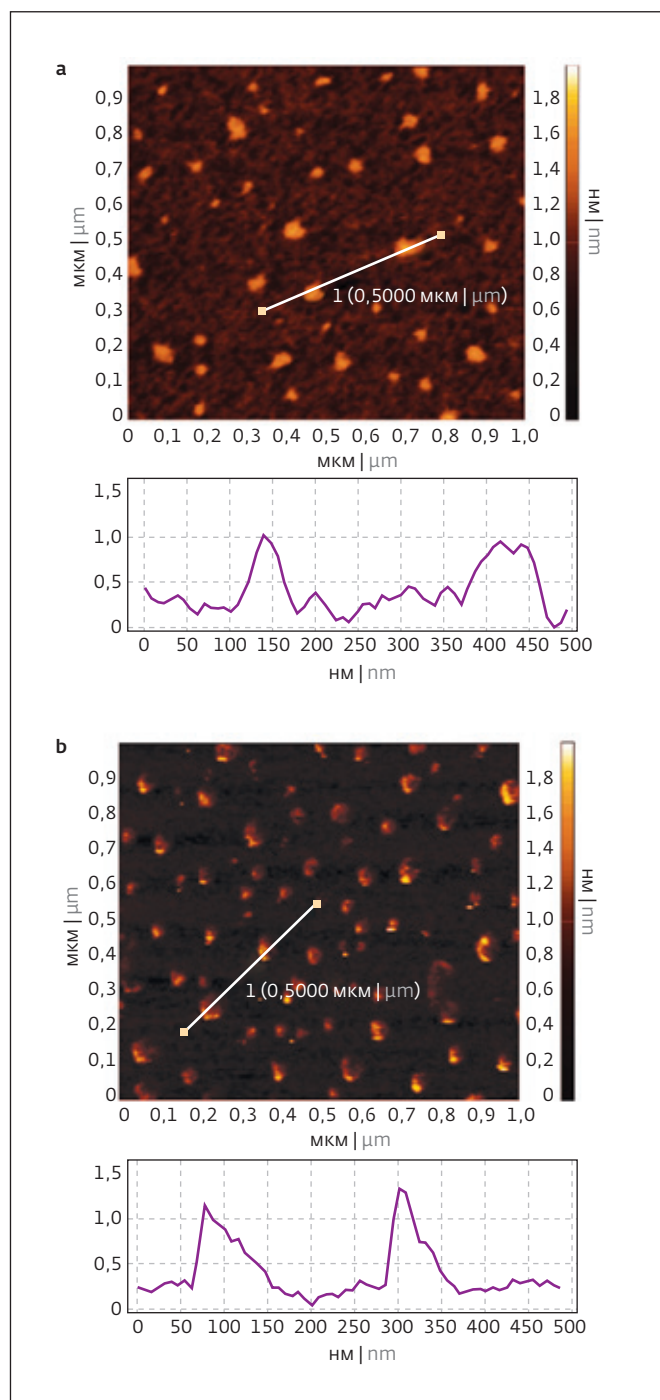


Рис.2. Результаты АСМ-измерений. Типичные АСМ-изображения поверхности свежесколотой слюды с адсорбированными биомолекулами ПХ (слева) и сечения, соответствующие линиям на этих изображениях (справа), полученные в контрольных экспериментах (а) и в режиме "пост-движения" глицерина (б)

Fig.2. Results of AFM measurements. Typical AFM images of the surface of freshly cleaved mica with adsorbed HRP biomacromolecules (left) and cross-sections corresponding to the lines in these images (right), obtained in control experiments (a) and in the "post-motion" mode with glycerol (b)

с биомолекулами ПХ, адсорбированными из 0,1 мкМ растворов ПХ в рабочих и контрольных экспериментах.

Как видно из рис.2(а), в контрольных экспериментах были визуализированы компактные объекты с высотой 1-1,2 нм, которые можно отнести к биомолекулам ПХ, так как объекты с высотами более 0,5 нм в холостых опытах не наблюдались.

В случае экспериментов в режиме "пост-движения" глицерина также были визуализированы объекты компактной формы, как и в случае контрольных экспериментов (рис.2б).

На рис.3 приведены результаты обработки данных сканирования – кривые функций распределения $\rho(h)$ визуализированных объектов по высотам и соответствующие гистограммы адсорбированных частиц по высотам для режима "пост-движения" глицерина и контрольных экспериментов.

Как видно из рис.3, в контрольных экспериментах функция распределения $\rho(h)$ имеет максимум при $h_{\max} = 1,0 \pm 0,2$ нм и с шириной на полувысоте $W = 0,5$ нм. Как известно, молекулярная масса ПХ составляет 40–44 кДа [19, 20], для которой (по литературным данным) АСМ-изображения мономеров имеют высоты 1 нм [24]. Исходя из этого, объекты с высотой АСМ-изображений 1,0 нм, наблюдаемые на поверхности свежесколотой слюды, могут быть отнесены к мономерной форме ПХ.

В случае режима "пост-движения" глицерина наблюдается смещение максимума функции $\rho(h)$ вправо ($h_{\max} = 1,3$ нм; рис.3, фиолетовая линия) и уширение распределения на полувысоте ($W = 0,8$ нм) с увеличением вклада частиц в правое крыло распределения. Следовательно, наблюдается появление объектов с увеличенными высотами АСМ-изображений, которые могут быть отнесены к агрегатам ПХ.

Результаты спектрофотометрической оценки активности ПХ в ее реакции с субстратом АБТС в рабочих и контрольных экспериментах приведены на рис.4.

Как видно из рис.4, ферментативная активность ПХ в рабочем эксперименте в случае расположения пробирки с раствором в режиме "пост-движения" глицерина не изменяется по сравнению с контрольным экспериментом. Отметим, что в "режиме движения" глицерина (как нами было показано ранее [8]) ферментативная активность ПХ существенно (на 25 %) снижалась по сравнению с контрольным экспериментом.

ОБСУЖДЕНИЕ

В работе проводилось исследование влияния "пост-движения" глицерина на адсорбционные свойства фермента на выходе линейного участка

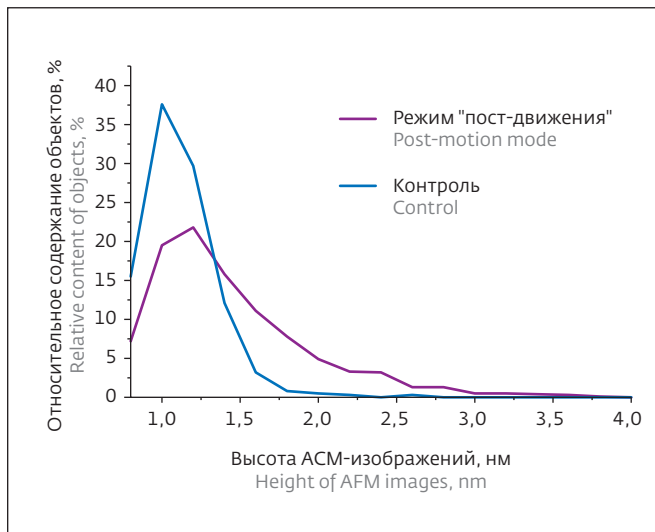


Рис.3. Результаты обработки АСМ-данных. Кривые функций распределения $\rho(h)$ визуализированных объектов по высотам, полученные в контрольных экспериментах (синяя линия) и в рабочих экспериментах в режиме "пост-движения" глицерина (фиолетовая линия)

Fig.3. Results of AFM data processing. Distribution function $\rho(h)$ curves of visualized objects with heights obtained in control experiments (blue line) and in working experiments in the "post-motion" mode with glycerol (violet line)

спиральной коммуникации. Было показано, что для этого режима наблюдается повышение степени агрегации белка, на что указывало повышение вклада АСМ-изображений объектов с большими высотами в правом крыле распределения по сравнению с контролем. Эта картина была похожа на ту, что наблюдалась ранее для режима движения глицерина [8]. Однако между этими двумя режимами были различия, заключающиеся в том, что для режима "пост-движения" глицерина активность фермента не менялась, в отличие от изученного ранее режима движения глицерина [8]. Повышение агрегации белка в рабочих экспериментах указывает на возможное изменение гидратации белковой оболочки глобулы, когда раствор белка инкубировался вблизи выходной коммуникации. Это, в свою очередь, может приводить к изменению взаимодействия белковых глобул между собой и с отрицательно заряженной поверхностью слюды. Отметим, что разница во влиянии режима измерения на активность фермента может свидетельствовать о том, что в режиме "пост-движения" глицерина не наблюдается существенного изменения структуры фермента в области активного центра по сравнению с режимом движения глицерина [8], где ферментативная активность ПХ понижалась. Важно отметить, что эффект

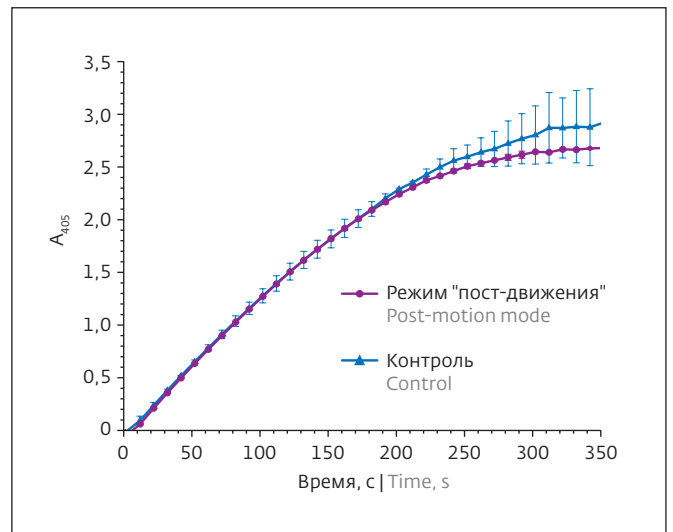


Рис.4. Спектрофотометрическая оценка ферментативной активности ПХ. Типичные зависимости изменения оптической плотности раствора при длине волны 405 нм от времени, полученные для контрольного раствора ПХ (синяя линия) и для раствора ПХ, подвергнутого воздействию в режиме "пост-движения" глицерина (фиолетовая линия). Условия эксперимента: ПХ:АБТС: H_2O_2 = 1 нМ:0,3 мМ:2,5 мМ

Fig.4. Spectrophotometry estimation of the enzymatic activity of HRP. Typical time dependences of the change in the absorbance of the solution at a wavelength of 405 nm obtained for the control HRP solution (blue line) and for the HRP solution exposed to the post-motion mode of glycerol (violet line). Experimental conditions: HRP:ABTS: H_2O_2 = 1 nM:0.3 mM:2.5 mM

по влиянию "пост-движения" глицерина на адсорбционные свойства белка сохранялся в течение 40 мин после выключения потока глицерина.

Полученные в наших экспериментах результаты следует учитывать при создании новых высокочувствительных биосенсорных систем, предназначенных для исследования белков и ферментов. Кроме того, полученные нами результаты важны для моделирования гемодинамических процессов при патологиях, связанных с нарушением системы кровообращения.

ВЫВОДЫ

С использованием метода АСМ исследована адсорбция единичных молекул белка ПХ из раствора, расположенного вблизи линейной части спиральной коммуникации. Был обнаружен пост-эффект, сохранявшийся в течение 40 мин после остановки потока глицерина. Этот пост-эффект выражался в повышенной адсорбции ПХ на поверхность АСМ-подложки из слюды. При этом ферментативная активность ПХ не изменялась.



Полученные результаты следует учитывать при разработке биосенсоров для ферментных систем и анализе полученных результатов после выключения проточных режимов, а также эти результаты важны для моделирования гемодинамических процессов при патологии.

БЛАГОДАРНОСТИ

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

Измерения на атомно-силовом микроскопе выполнены при использовании уникальной научной установки "Авогадро".

ИНФОРМАЦИЯ О РЕЦЕНЗИРОВАНИИ

Редакция благодарит анонимного рецензента (рецензентов) за их вклад в рецензирование этой работы, а также за размещение статей на сайте журнала и передачу их в электронном виде в НЭБ eLIBRARY.RU.

Декларация о конфликте интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. **Doran P.M.** Heat transfer. In Bioprocess Engineering Principles, second edition. Ed. by P.M.Doran // Academic Press. Elsevier Ltd.: Kidlington, Oxford, UK, 2013; PP. 333–377.
2. **Pauling L.** General chemistry, third edition // W.H.Freeman and company: San Francisco, CA, USA, 1970.
3. **Jacobsen D., McMartin K.E.** Alcohols and glycols. In Human Toxicology. Ed. by J. Descotes // Elsevier Science B.V.: Amsterdam, The Netherlands, 1996; PP. 623–648. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-81557-6.X5000-X>
4. **Tanasescu F., Cramariuc R.** Electrostatica in Technica // Editura tehnica: Bucuresti, Romania, 1977.
5. **Whitesides G.M., McCarty L.S.** Electrostatic Charging Due to Separation of Ions at Interfaces: Contact Electrification of Ionic Electrets. *Angew Chem Int Ed* 2008. 47(12), PP. 2188–2207. <https://doi.org/10.1002/anie.200701812>
6. **Choi D., Lee H., Im D.J., Kang I.S., Lim G., Kim D.S., Kang K.H.** Spontaneous electrical charging of droplets by convetional pipetting. *Sci Rep* 2013. 3(1), 2037. <https://doi.org/10.1038/srep 02037>
7. **Balmer R.T.** Electrostatic generation in dielectric fluids: the viscoelectric effect. *Proceedings of WTC2005 World Tribology Congress III* September 12-16, 2005, Washington, D.C., USA. Paper No. WTC2005-63806. <https://doi.org/10.1115/WTC2005-63806>
8. **Ivanov Yu.D., Pleshakova T.O., Shumov I.D., Kozlov A.F., Ivanova I.A., Ershova M.O., Tatur V.Yu., Ziborov V.S.** AFM Study of the Influence of Glycerol Flow on Horseradish Peroxidase near the in/out Linear Sections of a Coil. *Applied Sciences*, 2021. 11(4), 1723.
9. **Медянцева Э.П., Бейлинсон Р.М., Николаенко А.И., Будников Г.К.** Пероксидаза хрена – аналитические возможности при определении зеараленона // *Журнал аналитической химии*. 2022. 77(6). С. 522–532.
10. **Sheng Y., Wang K., Lu Q.** et al. Nanobody-horseradish peroxidase fusion protein as an ultrasensitive probe to detect antibodies against Newcastle disease virus in the immunoassay // *J Nanobiotechnol*. 2019. 17, 35. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0468-0>
11. **Lu Q., Li X., Zhao J.** et al. Nanobody-horseradish peroxidase and EGFP fusions as reagents to detect porcine parvovirus in the immunoassays // *J Nanobiotechnol*. 2020. 18, 7. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0568-x>
12. **Karatani H.** Luminol-hydrogen peroxide-horseradish peroxidase chemiluminescence intensification by kosmotrope ammonium sulfate // *Anal Sci*. 2022. 38, 613–621. <https://doi.org/10.1007/s44211-022-00069-8>
13. **Carnes M.E., Gonyea C.R., Mooney R.G., Njihia J.W., Coburn J.M., Pins G.D.** Horseradish Peroxidase-Catalyzed Crosslinking of Fibrin Microthread Scaffolds // *Tissue Eng Part C: Methods*. Jun 2020. PP. 317–331. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2020.0083>
14. **Humer D., Furlanetto V., Schruel A., Wlodarczyk A., Kuttke M., Divne C., Spadiut O.** Potential of unglycosylated horseradish peroxidase variants for enzyme prodrug cancer therapy // *Bio-medicine & Pharmacotherapy*. 2021. 142, 112037. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112037>
15. **Humer D., Spadiut O.** Improving the Performance of Horseradish Peroxidase by Site-Directed Mutagenesis // *Int J Mol Sci*. 2019. 20(4): 916. <https://doi.org/10.3390/ijms20040916>
16. **Xiong Y., Wang C., Wu Y.F., Luo C., Zhan D., Wang S.** Electrochemical Enzyme Sensor Based on the Two-Dimensional Metal-Organic Layers Supported Horseradish Peroxidase // *Molecules*. 2022. 27(23), 8599. <https://doi.org/10.3390/molecules27238599>

