

УДК 577.3

DOI: 10.18384/2949-5067-2024-1-20-32

РЕГИСТРАЦИЯ АКТИВНОСТИ ЕДИНИЧНЫХ МОЛЕКУЛ АСПАРАГИНАЗЫ С ПОМОЩЬЮ НАНОПОРОВОГО ДЕТЕКТОРА

Иванов Ю. Д.^{1,2}, Аблеев А. Н.¹, Шумянцева В. В.¹, Жданов Д. Д.¹, Покровская М. В.¹, Александрова С. С.¹, Иванова И. А.¹, Виноградова А. В.¹, Неведрова Е. Д.¹, Зиборов В. С.^{1,2}, Ваулин Н. В.³, Лебедев Д. В.³, Букатин А. С.³, Мухин И. С.³, Арчаков А. И.¹

¹ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича 119121, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8, Российская Федерация

² Объединённый институт высоких температур Российской академии наук 125412, г. Москва, ул. Ижорская, д. 13, стр. 2, Российская Федерация

³ Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж. И. Алфёрова Российской академии наук 194021, г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 8, корп. 3, литер А, Российская Федерация

Аннотация

Цель. Изучить возможность использования нанопор для мониторинга функционирования аспарагиназы.

Процедура и методы. В работе была сконструирована нанопора на базе SiN, в которую встраивали молекулу L-аспарагиназы. Мониторинг каталитической активности встроенной в нанопору единичной молекулы L-аспарагиназы осуществляли, наблюдая за изменением ионного тока в ячейке с этой нанопорой. Этот подход полезен для исследования каталитической активности на базе встроенных в нанопору единичных молекул ферментов.

Результаты. Был создан нанопоровый детектор для исследования активности аспарагиназы. Было получено, что этот детектор позволял проводить мониторинг активности этого фермента в реальном времени без использования меток.

Теоретическая и/или практическая значимость. Показано, что нанопоровый детектор, с размером нанопоры порядка 6 нм, может быть использован для исследования активности аспарагиназы. При этом возможно проводить в реальном времени контроль изменения формы аспарагиназы, который заключается в контроле изменения тока проводимости, проходящего через нанопору, в котором была иммобилизована аспарагиназа. Полученные результаты могут быть полезны при анализе работы ферментов на уровне единичных молекул с помощью нанопорового детектора.

Ключевые слова: нанопора, аспарагиназа, аспарагин, каталитическая активность

Благодарности. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы)

(№ 122030100168-2). Авторы выражают благодарность ОИВТ РАН за подготовку образцов. Работа по подготовке образцов была финансово поддержана за счёт субсидий на выполнение государственного задания № 075-01056-22-02.

REGISTRATION OF ASPARAGINASE SINGLE MOLECULE ACTIVITY USING A NANOPORE DETECTOR

Yu. Ivanov^{1,2}, A. Ableev¹, V. Shumyantseva¹, D. Zhdanov¹, M. Pokrovskaya¹, S. Aleksandrova¹, I. Ivanova¹, A. Vinogradova¹, E. Nevedrova¹, V. Ziborov², N. Vaulin³, D. Lebedev³, A. Bukatin³, I. Mukhin³, A. Archakov¹

¹ *Institute of Biomedical Chemistry
ulitsa Pogodinskaya 10 build. 8, Moscow 119121, Russian Federation*

² *Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences
ulitsa Izhorskaya 13, Moscow 125412, Russian Federation*

³ *Alferov Federal State Budgetary Institution of Higher Education and Science Saint Petersburg
National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences
ulitsa Khlopina 8 build. 3 letter A, St. Petersburg 194021, Russian Federation*

Abstract

Aim. The possibility of using a nanopore to monitor the functioning of asparaginase has been studied.

Methodology. In this work, a SiN-based nanopore was constructed in which the L-asparaginase molecule was embedded.

The catalytic activity of the L-asparaginase molecule, embedded in the nanopore, has been monitored by observing the change in the ion current in the cell with this nanopore. This approach is useful for studying the catalytic activity based on single enzyme molecules embedded in a nanopore.

Results. A nanopore detector for studying the catalytic activity of L-asparaginase has been developed. It has been found that this detector made it possible to monitor the activity of this enzyme.

Research implications. It has been shown that a nanopore detector, with a nanopore size of the order of 6 nm, can be used to study the activity of asparaginase. It is possible to carry out real-time monitoring of changes in the form of L-asparaginase, which consisted in monitoring changes in the ion current passing through a nanopore, in which asparaginase was immobilized. The results obtained can be of use in the analysis of the functioning of enzymes at the level of single molecules.

Keywords: nanopore, asparaginase, asparagine, catalytic activity

Acknowledgments. The work was carried out within the framework of the Program for Basic Scientific Research in the Russian Federation for the long-term period (2021–2030) (No. 122030100168-2). The authors express their gratitude to the Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences for preparing the samples. The sample preparation work was financially supported by subsidies for the implementation of state assignment No. 075-01056-22-02.

Введение

L-аспарагиназа принадлежит к ферментам класса гидролаз, который катализирует гидролиз L-аспарагина с образованием L-аспарагиновой кислоты и иона аммония. Этот фермент при внутривенном введении в организм человека снижает концентрацию аспарагина в крови. Этот фермент имеет противоопухолевую активность и является частью комбинированной противоопухолевой терапии острого лимфобластного лейкоза (ОПЛ) у детей и взрослых [1]. Для лечения ОПЛ используют только L-аспарагиназу II типа, поскольку L-аспарагиназа I типа не обладает терапевтической активностью [2]. Сродство к аспарагину аспарагиназы II типа составляет $K_m \sim 10^{-2}$. Этот фермент является гомотетрамером с молекулярной массой порядка 140 кДа, гомотетрамер которого состоит из мономеров массой 36 кДа [3]. Два мономера аспарагиназы соединены между собой в два димера, которые объединяются и образуют тетрамер [3; 4]. Фермент может существовать без субстрата в открытом состоянии, которое при связывании с субстратом переходит в закрытое. После чего реакция идёт в две стадии. Нуклеофильный треонин, расположенный вблизи активного центра фермента, взаимодействует с карбонильной группой аспарагина с образованием промежуточного продукта ацил-фермента. При этом от субстрата отщепляется молекула аммиака. Затем ацил-фермент реагирует с молекулой воды с освобождением L-аспарагиназы и образованием аспартата [5]. L-аспарагиназа может функционировать при $pH = 5-10$ [6].

Известно, что каталитическая активность фермента, определяемая стандартными методами в биохимии, является величиной усреднённой. В последнее время начала развиваться наука под названием «Энзимология единичных молекул», которая позволяет измерять активность единичных молекул фермента. Основным инструментом для измерения единичной активности молекул ферментов являлась атомно-силовая микроскопия [7; 8; 9]. Этим методом можно было измерять активность ферментов по мониторингу изменения высоты фермента в процессе каталитического цикла. Однако этот метод достаточно трудоёмкий и времязатратный.

В последнее время началось использование нанопоровой технологии как метода детекции единичных молекул фермента, который измеряет ионный ток, возникающий при функционировании фермента, вблизи нанопоры [10; 11]. Работа нескольких ферментов из семейства протеаз таких, как HIV-1 протеаза [11], трипсин [12] и ринин протеаза [13], были детектированы при измерении транслокации расщеплённых пептидов через нанопору. При этом измерялся ионный ток, изменяющийся при функционировании ферментов. Однако описанный выше подход использовал мембранную пору, сформированную из белков, что затрудняет использование нанопоровой технологии для анализа ферментов широкого класса из-за того, что размеры нанопоры определяются исключительно размерами нанопоровой структуры, образованной этими белками, также чувствительными к концентрациям буфера, величине pH и другим условиям [14; 15].

Наиболее перспективным направлением в нанопоровой технологии для исследования активности фермента является технология, на базе использования твердотельной нанопоры с диаметром поры порядка 5 нм [16]. Твердотельная нанопора может быть сконструирована с помощью различных методов, таких как сфокусированный ионный пучок (ФИБ) [16], управляемый пробой диэлектрика (SDB) [17; 18], и электронно-лучевое просверливание (electron-beam drilling EBD) [19]. Si_x-N_y является часто используемым материалом для создания нанопоры.

В нашей работе мы использовали для изготовления нанопорового детектора технологию EBD в SiN. В качестве кюветы была использована измерительная ячейка, разделённая на две части и в эту разделительную пластинку была вмонтирована SiN нанопора. В эту нанопору был встроен фермент аспарагиназы. К двум частям кюветы было приложено напряжение, и регистрировался ток, протекающий через эту нанопору. Было получено, что при функционировании фермента наблюдается открытие нанопоры. Полученные результаты могут быть полезны при исследовании ферментативных реакций на уровне единичных молекул ферментов, а также при создании устройств в терапевтических целях.

Материалы и методы

Реактивы

Буфер PBSB, pH 7.6, C = 1 mM, бидистиллированная деионизованная вода, полученная на установке Millipore (18.2 MoM).

L-аспарагин моногидрат был получен НПП НПП «ПанЭко» (Россия). Для приготовления раствора аспарагина, полученный аспарагин был растворен в 1 mM PBSB до концентрации 10⁻⁵ моль/л, после чего был подогрет до температуры 90°C в течение 3 минут, а затем был перемешан с помощью мешалки Vortex в течение 2 минут.

L-asparaginase *E. carotovora* была клонирована и очищена в лаборатории медицинской биотехнологии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В. Н. Орехович (ИБМХ) согласно предварительно описанным протоколам [20] и разведена в 1 mM PBSB буфере до концентраций 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ M.

Нанопоровый детектор

Нанопоровый детектор представлял из себя измерительную ячейку из материала PDMS, разделённую пополам перемычкой, куда вставлялся чип с единичной нанопорой SiN. Диаметр нанопоры составлял порядка 6 нм, толщина нанопоры составляла порядка 40 нм. Изготовление нанопоры проводилось с использованием электронного пучка, образованного с помощью высокоразрешающего ТЕМ (JEM 2100f). Для изготовления нанопорового детектора нанопора была вставлена в специальное крепёжное место и промыта бидистиллированной деионизованной водой непосредственно перед измерениями.

Два резервуара измерительной ячейки заполнялись объёмом 700 мкл (транс- и цис-) буферного раствора 1 mM PBSD (pH 7.6). Ag/AgCl электроды были встроены в два резервуара измерительной ячейки для записи ионного тока, проходящего через нанопору. Нанопоровый детектор был помещён в ячейку Фарадея для уменьшения электростатических наводок. Для измерений тока через нанопору использовали патч-кламп усилитель с уровнем собственного токового шума 0,3 фА. в полосе частот 1000 Гц. Напряжение изменялось в пределах от -300 до 300 мВ. Регистрация сигнала от нанопоры проводилась с частотой 10 кГц с помощью 16-разрядного АЦП. Далее сигнал подвергался цифровой фильтрации с помощью низкочастотного фильтра Баттерфорта с частотой среза 1000 Гц. При необходимости, после измерения чип промывался дистиллированной водой для удаления остатков соли и снова устанавливался в измерительную ячейку.

Эксперимент

Непосредственно перед измерениями чип промывался бидистиллированной деионизованной водой, после чего в обе стороны измерительной ячейки вносился 1 mM PBSD буфер и записывался нулевой сигнал около -100 пА (см. рис. 1).

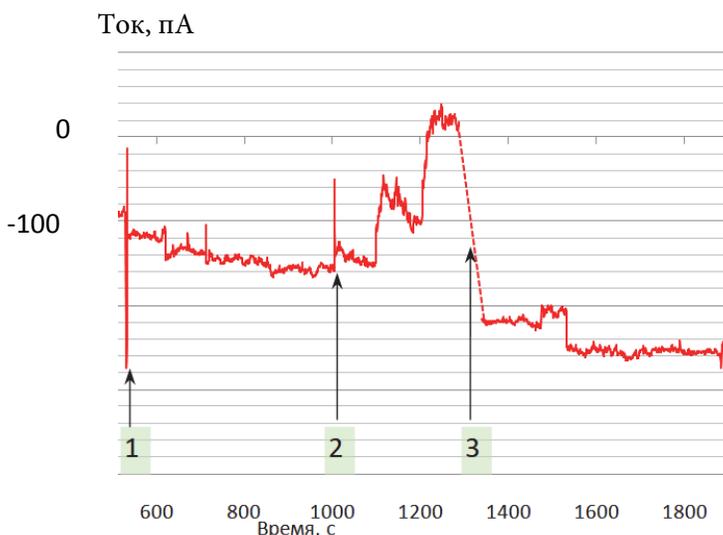


Рис. 1 / Fig. 1. Зависимость ионного тока от времени при напряжении $U = -200$ мВ. Добавление 1 mM PBSD буфера (1), добавление в цис-камеру аспарагиназы 10^{-7} М (2), добавление в цис-камеру аспарагина $C_M = 10^{-5}$ М (3).

Измерения были проведены в 1 mM PBSD pH 7.8 /

Dependence of ion current on time at voltage $U = -200$ mV. Adding 1 mM PBSD buffer (1), adding 10^{-7} M asparaginase to the cis-chamber (2), adding $C_M = 10^{-5}$ M asparagine to the cis-chamber (3). Measurements were carried out in 1 mM PBSD pH 7.8

Источник: по данным авторов

После этого, выдержав время около 400 сек, в цис-камеру добавлялся раствор аспарагиназы при концентрации 10^{-7} М (2). При этом наблюдали понижение проводимости нанопоры практически до 0. После этого добавляли раствор аспарагина в цис-камеру в концентрации $C = 10^{-5}$ М. При этом наблюдалось открытие нанопоры. Это происходило, вероятно, за счёт того, что аспарагиназа в процессе функционирования изменяла свою структуру, позволяя проходить току через нанопору, которую до этого она закрывала.

Обсуждение

В работе было получено, что при добавлении аспарагиназы в ячейку при повышении её концентрации до 10^{-7} М в ячейке наблюдается понижение тока, протекающего через нанопору. Это означает, что при этой концентрации аспарагиназа закрывает пору, что приводит к понижению протекающего через пору тока. Затем проводилось добавление аспарагина, который является субстратом аспарагиназы в транс-ячейку. Это приводило к тому, что аспарагиназа начинала функционировать и изменять свою структуру, при этом приоткрывая нанопору, что позволяло увеличиваться току, проходящему через нанопору из цис- в транс-часть кюветы. Кроме этого, были проведены контрольные эксперименты по добавлению аспарагина в цис-часть кюветы в отсутствие аспарагиназы в кювете, при этом не наблюдая существенного изменения сигнала.

Таким образом, в работе удалось наблюдать функционирование аспарагиназы в присутствии аспарагина, причём когда аспарагиназа вначале закрывала нанопору, не давая проходить току из цис- в транс-часть измерительной ячейки. Полученные результаты важны для создания новой системы регистрации функциональной активности аспарагиназы на уровне единичных молекул этого фермента.

Заключение

В работе была исследована возможность использования нанопоры для исследования аспарагиназы в процессе её каталитического цикла. Было показано, что нанопоровый детектор с размером нанопоры порядка 6 нм может быть использован для исследования активности аспарагиназы. При этом возможно проводить в реальном времени контроль изменения формы аспарагиназы, который заключался в мониторинге изменения ионного тока, проходящего через нанопору, в которой была иммобилизована аспарагиназа. Полученные результаты могут быть полезны при анализе работы ферментов на уровне единичных молекул с помощью нанопорового детектора.

Статья поступила в редакцию 01.11.2023 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent / Verma N., Kumar K., Kaur G., Anand S. // *Critical reviews in biotechnology*. 2007. Vol. 27. Iss. 1. P. 45–62. DOI: 10.1080/07388550601173926.
2. L-asparaginase / Whitecar J. P. Jr, Bodey G. P., Harris J. E., Freireich E. J. // *The New England Journal of Medicine*. 1970. Vol. 282. No. 13. P. 732–734. DOI: 10.1056/NEJM197003262821307.
3. Kozak M., Jurga S. A comparison between the crystal and solution structures of *Escherichia coli* asparaginase II // *Acta Biochimica Polonica*. 2002. Vol. 49. No. 2. P. 509–513.
4. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy / Swain A. L., Jaskólski M., Housset D, Rao J. K, Wlodawer A. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993. Vol. 90. no. 4. P. 1474–1478. DOI: 10.1073/pnas.90.4.1474.
5. A covalently bound catalytic intermediate in *Escherichia coli* asparaginase: Crystal structure of a Thr-89-Val mutant / Palm G. J., Lubkowski J., Derst C., Schleper S., Röhm K. H., Wlodawer A. // *FEBS Letters*. 1996. Vol. 390. No. 2. P. 211–216. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00660-6.
6. Исследование вторичной структуры L-аспарагиназы в широком интервале значений pH / Илларионова И. Г., Петров Л. И., Олейникова Л. В., Рощин С. Н., Пасечник В. А., Халяпин Б. Д., Полоцкий А. Е., Воинова Н. Е., Штукина Т. Б. // *Молекулярная Биология*. 1980. Т. 14. № 4. С. 951–955.
7. АСМ-визуализация, измерение активности и физико-химических свойств единичных мономеров и олигомеров ферментов / Иванов Ю. Д. Бухарина Н. С., Плешакова Т. О., Французов П. А., Крохин Н. В., Зиборов В. С., Арчаков А. И. // *Биофизика*. 2011. Т. 56. № 5. С. 939–944.
8. АСН-нанотехнология для визуализации, счёта, определения упругости и активности единичных белков цитохром Р 450-содержащих монооксигеназных систем / Иванов Ю. Д., Бухарина Н. С., Французов П. А., Плешакова Т. О., Мунро А. В., Хуэй Бон Хоа Г., Арчаков А. И. // *Нанотехнологии и охрана здоровья*. 2010. Т. 2. № 1. С. 30–35.
9. Direct observation of enzyme activity with the atomic force microscope / Radmacher M., Fritz M., Hansma H. G., Hansma P. K. // *Science*. 1994. Vol. 265. No. 5178. P. 1577–1579. DOI: 10.1126/science.8079171.
10. A nanopore approach for analysis of caspase-7 activity in cell lysates / Pham B., Eron S. J., Hill M. E., Li X., Fahie M. A., Hardy J. A., Chen M. // *Biophysical Journal*. 2019. Vol. 117. No. 5. P. 844–855. DOI: 10.1016/j.bpj.2019.07.045.
11. Real-time label-free measurement of HIV-1 protease activity by nanopore analysis / Wang L., Han Y., Zhou S., Guan X. // *Biosensors and Bioelectronics*. 2014. Vol. 62. P. 158–162. DOI: 10.1016/j.bios.2014.06.041.
12. Label-free nanopore single-molecule measurement of trypsin activity / Zhou S., Wang L., Chen X, Guan X. // *ACS Sensors*. 2016. Vol. 1. No. 5. P. 607–613. DOI: 10.1021/acssensors.6b00043.
13. Kukwikila M., Howorka S. Nanopore-based electrical and label-free sensing of enzyme activity in blood serum // *Analytical Chemistry*. 2015. Vol. 87. No. 18. P. 9149–9154. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01764.
14. Translocation of double-stranded DNA through membrane-adapted phi29 motor protein nanopores / Wendell D., Jing P., Geng J., Subramaniam V., Lee T. J., Montemagno C., Guo P. // *Nature Nanotechnology*. 2009. Vol. 4. No. 11. P. 765–772. DOI: 10.1038/nnano.2009.259.

15. An engineered ClyA nanopore detects folded target proteins by selective external association and pore entry / Soskine M., Biesemans A., Moeyaert B., Cheley S., Bayley H., Maglia G. // *Nano letters*. 2012. Vol. 12. No. 9. P. 4895–4900. DOI: 10.1021/nl3024438.
16. Ion-beam sculpting at nanometre length scales / Li J., Stein D., McMullan C., Branton D. Aziz M. J., Golovchenko J. A. // *Nature*. 2001. Vol. 412. No. 6843. P. 166–169. DOI: 10.1038/35084037.
17. Kwok H., Briggs K., Tabard-Cossa V. Nanopore fabrication by controlled dielectric breakdown // *PLOS ONE*. 2014. Vol. 9. Iss. 3. P. e92880. DOI: 10.1371/journal.pone.0092880.
18. Solid-state nanopore fabrication by automated controlled breakdown / Waugh M., Briggs K., Gunn D., Gibeault M., King S., Ingram Q., Jimenez A. M., Berryman S., Lomovtsev D., Andrzejewski L., Tabard-Cossa V. // *Nature Protocols*. 2020. Vol. 15. No. 1. P. 122–143. DOI: 10.1038/s41596-019-0255-2.
19. Ionic field effect transistors with sub-10 nm multiple nanopores / Nam S.-W., Rooks M. J., Kim K.-B., Rossmagel S. M. // *Nano letters*. 2009. Vol. 9. No. 5. P. 2044–2048. DOI: 10.1021/nl900309s.
20. Structural and functional insights into *Erwinia carotovora* l-asparaginase / Papageorgiou A. C., Posypanova G. A., Andersson C. S., Sokolov N. N., Krasotkina J. // *The FEBS Journal*. 2008. Vol. 275. Iss. 17. P. 4306–4316.

REFERENCES

1. Verma N., Kumar K., Kaur G., Anand S. L-asparaginase: a promising chemotherapeutic agent. In: *Critical reviews in biotechnology*, 2007, vol. 27, iss. 1, pp. 45–62. DOI: 10.1080/07388550601173926.
2. Whitecar J. P. Jr, Bodey G. P., Harris J. E., Freireich E. J. L-asparaginase. In: *The New England Journal of Medicine*, 1970, vol. 282, no. 13, pp. 732–734. DOI: 10.1056/NEJM197003262821307.
3. Kozak M., Jurga S. A comparison between the crystal and solution structures of *Escherichia coli* asparaginase II. In: *Acta Biochimica Polonica*, 2002, vol. 49, no. 2, pp. 509–513.
4. Swain A. L., Jaskólski M., Housset D., Rao J. K., Wlodawer A. Crystal structure of *Escherichia coli* L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, vol. 90, no. 4, pp. 1474–1478. DOI: 10.1073/pnas.90.4.1474.
5. Palm G. J., Lubkowski J., Derst C., Schleper S., Röhm K. H., Wlodawer A. A covalently bound catalytic intermediate in *Escherichia coli* asparaginase: Crystal structure of a Thr-89-Val mutant. In: *FEBS Letters*, 1996, vol. 390, no. 2, pp. 211–216. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00660-6.
6. Illarionova I. G., Petrov L. I., Oleynikova L. V., Roshchin S. N., Pasechnik V. A., Khalyapin B. D., Polotskiy A. Ye., Voinova N. Ye., Shtukina T. B. [Study of the secondary structure of L-asparaginase in a wide range of pH values]. In: *Molekulyarnaya Biologiya [Molecular Biology]*, 1980, vol. 14, no. 4, pp. 951–955.
7. Ivanov Yu. D., Bukharina N. S., Pleshakova T. O., Frantsuzov P. A., Krokhin N. V., Ziborov V. S., Archakov A. I. [Atomic force microscopy visualization and measurement of the activity and physicochemical properties of single monomeric and oligomeric enzymes]. In: *Biofizika [Biophysics]*, 2011, vol. 56, no. 5, pp. 939–944.
8. Ivanov Yu. D., Bukharina N. S., Frantsuzov P. A., Pleshakova T. O., Munro A. V., Hui Bon Hoa G., Archakov A. I. [ASN nanotechnology for visualization, counting, determination of elasticity and activity of single proteins of cytochrome P 450-containing monooxygenase

- systems]. In: *Nanotekhnologii i okhrana zdorov'ya* [Nanotechnologies and health care], 2010, vol. 2, no. 1, pp. 30–35.
9. Radmacher M., Fritz M., Hansma H. G., Hansma P. K. Direct observation of enzyme activity with the atomic force microscope. In: *Science*, 1994, vol. 265, no. 5178, pp. 1577–1579. DOI: 10.1126/science.8079171.
 10. Pham B., Eron S. J., Hill M. E., Li X., Fahie M. A., Hardy J. A., Chen M. A nanopore approach for analysis of caspase-7 activity in cell lysates. In: *Biophysical Journal*, 2019, vol. 117, no. 5, pp. 844–855. DOI: 10.1016/j.bpj.2019.07.045.
 11. Wang L., Han Y., Zhou S., Guan X. Real-time label-free measurement of HIV-1 protease activity by nanopore analysis. In: *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, vol. 62, pp. 158–162. DOI: 10.1016/j.bios.2014.06.041.
 12. Zhou S., Wang L., Chen X., Guan X. Label-free nanopore single-molecule measurement of trypsin activity. In: *ACS Sensors*, 2016, vol. 1, no. 5, pp. 607–613. DOI: 10.1021/acssensors.6b00043.
 13. Kukwikila M., Howorka S. Nanopore-based electrical and label-free sensing of enzyme activity in blood serum. In: *Analytical Chemistry*, 2015, vol. 87, no. 18, pp. 9149–9154. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01764.
 14. Wendell D., Jing P., Geng J., Subramaniam V., Lee T. J., Montemagno C., Guo P. Translocation of double-stranded DNA through membrane-adapted phi29 motor protein nanopores. In: *Nature Nanotechnology*, 2009, vol. 4, no. 11, pp. 765–772. DOI: 10.1038/nnano.2009.259.
 15. Soskine M., Biesemans A., Moeyaert B., Cheley S., Bayley H., Maglia G. An engineered ClyA nanopore detects folded target proteins by selective external association and pore entry. In: *Nano letters*, 2012, vol. 12, no. 9, pp. 4895–4900. DOI: 10.1021/nl3024438.
 16. Li J., Stein D., McMullan C., Branton D., Aziz M. J., Golovchenko J. A. Ion-beam sculpting at nanometre length scales. In: *Nature*, 2001, vol. 412, no. 6843, pp. 166–169. DOI: 10.1038/35084037.
 17. Kwok H., Briggs K., Tabard-Cossa V. Nanopore fabrication by controlled dielectric breakdown. In: *PLOS ONE*, 2014, vol. 9, iss. 3, pp. e92880. DOI: 10.1371/journal.pone.0092880.
 18. Waugh M., Briggs K., Gunn D., Gibeault M., King S., Ingram Q., Jimenez A. M., Berryman S., Lomovtsev D., Andrzejewski L., Tabard-Cossa V. Solid-state nanopore fabrication by automated controlled breakdown. In: *Nature Protocols*, 2020, vol. 15, no. 1, pp. 122–143. DOI: 10.1038/s41596-019-0255-2.
 19. Nam S.-W., Rooks M. J., Kim K.-B., Rossnagel S. M. Ionic field effect transistors with sub-10 nm multiple nanopores. In: *Nano letters*, 2009, vol. 9, no. 5, pp. 2044–2048. DOI: 10.1021/nl900309s.
 20. Papageorgiou A. C., Posypanova G. A., Andersson C. S., Sokolov N. N., Krasotkina J. Structural and functional insights into *Erwinia carotovora* L-asparaginase. In: *The FEBS Journal*, 2008, vol. 275, iss. 17, pp. 4306–4316.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванов Юрий Дмитриевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией нанобиотехнологии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича; ведущий научный сотрудник лаборатории № 6.2. – ударно-волновых воздействий Объединённого института высоких температур Российской академии наук;
e-mail: Yurii.ivanov.nata@gmail.com

Аблеев Александр Нарманович – ведущий инженер лаборатории нанобиотехнологии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича;
e-mail: ableev@mail.ru

Шумянцева Виктория Васильевна – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биоэлектрохимии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича;
e-mail: v_shumyantseva@mail.ru

Жданов Дмитрий Дмитриевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией медицинской биотехнологии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича;
e-mail: zhdanovdd@mail.ru

Покровская Марина Владимировна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича;
e-mail: zhdanovdd@mail.ru

Александрова Светлана Серебеджановна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича;
e-mail: zhdanovdd@mail.ru

Иванова Ирина Александровна – младший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича;
e-mail: i.a.ivanova@bk.ru

Виноградова Ангелина Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича;
e-mail: angeluna1234@bk.ru

Неведрова Екатерина Дмитриевна – младший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича;
e-mail: nevedrova.kat@yandex.ru

Зиборов Вадим Серафимович – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории № 6.2. – ударно-волновых воздействий Объединённого института высоких температур Российской академии наук; ведущий специалист лаборатории нанобиотехнологии Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича;
e-mail: ziborov.vs@yandex.ru

Ваулин Никита Васильевич – аспирант по направлению «Физика полупроводников», лаборант лаборатории возобновляемых источников энергии Санкт-Петербургского национального исследовательского Академического университета имени Ж. И. Алфёрова Российской академии наук;
e-mail: denis.v.lebedev@gmail.com

Лебедев Денис Владимирович – кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории возобновляемых источников энергии Санкт-Петербургского национального исследовательского Академического университета имени Ж. И. Алфёрова Российской академии наук;
e-mail: denis.v.lebedev@gmail.com

Букатин Антон Сергеевич – кандидат физико-математических наук, доцент кафедры нанобиотехнологий, старший научный сотрудник лаборатории возобновляемых источников энергии Санкт-Петербургского национального исследовательского Академического университета имени Ж. И. Алфёрова Российской академии наук;
e-mail: denis.v.lebedev@gmail.com

Мухин Иван Сергеевич – доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией возобновляемых источников энергии Санкт-Петербургского национального исследовательского Академического университета имени Ж. И. Алфёрова Российской академии наук;
e-mail: denis.v.lebedev@gmail.com

Арчаков Александр Иванович – Академик РАН, доктор биологических наук, профессор, научный руководитель Научно-исследовательского института биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича;
e-mail: archak@ibmc.msk.ru

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Yurii D. Ivanov – Dr. Sci. (Biology), Prof., Laboratory Head, Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Biomedical Chemistry; Leading Researcher, Laboratory No. 6.2. – Shock Wave Effects, Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences;
e-mail: Yurii.ivanov.nata@gmail.com

Aleksandr N. Ableev – Leading Engineer, Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Biomedical Chemistry;
e-mail: ableev@mail.ru

Viktoriya V. Shumyantseva – Dr. Sci. (Biology), Prof., Laboratory Head, Laboratory of Bioelectrochemistry, Institute of Biomedical Chemistry;
e-mail: v_shumyantseva@mail.ru

Dmitry D. Zhdanov – Dr. Sci. (Biology), Prof., Laboratory Head, Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Biomedical Chemistry;
e-mail: zhdanovdd@mail.ru

Marina V. Pokrovskaya – Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Biomedical Chemistry;
e-mail: zhdanovdd@mail.ru

Svetlana S. Aleksandrova – Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Medical Biotechnology, Institute of Biomedical Chemistry;
zhdanovdd@mail.ru

Irina A. Ivanova – Research Assistant, Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Biomedical Chemistry;
e-mail: i.a.ivanova@bk.ru

Angelina V. Vinogradova – Research Assistant, Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Biomedical Chemistry;
e-mail: angeluna1234@bk.ru

Ekaterina D. Nevedrova – Research Assistant, Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Biomedical Chemistry;
e-mail: nevedrova.kat@yandex.ru

Vadim S. Ziborov – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Senior Researcher, Laboratory No. 6.2. – Shock Wave Effects, Joint Institute for High Temperatures of the Russian Academy of Sciences; Leading Specialist, Laboratory of Nanobiotechnology, Institute of Biomedical Chemistry;
e-mail: ziborov.vs@yandex.ru

Nikita V. Vaulin – Postgraduate Student, Department “Physics of Semiconductors”, Laboratory Assistant, Laboratory of Renewable Energy Sources, Saint Petersburg National Research Academic University named after J. I. Alfeyorov, Russian Academy of Sciences;
e-mail: denis.v.lebedev@gmail.com

Denis V. Lebedev – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Senior Researcher, Laboratory of Renewable Energy Sources, Saint Petersburg National Research Academic University named after J. I. Alfeyorov, Russian Academy of Sciences;
e-mail: denis.v.lebedev@gmail.com

Anton S. Bukatin – Cand. Sci. (Phys.-Math.), Assoc. Prof., Department of Nanobiotechnologies, Senior Researcher, Laboratory of Renewable Energy Sources, Saint Petersburg National Research Academic University named after J. I. Alfeyorov, Russian Academy of Sciences;
e-mail: denis.v.lebedev@gmail.com

Ivan S. Mukhin – Dr. Sci. (Phys.-Math), Prof., Laboratory Head, Laboratory of Renewable Energy Sources, Saint Petersburg National Research Academic University named after J. I. Alfeyorov, Russian Academy of Sciences;
e-mail: denis.v.lebedev@gmail.com

Aleksandr I. Archakov – Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biology), Prof., Scientific Director, Institute of Biomedical Chemistry;
e-mail: archak@ibmc.msk.ru

ПРАВИЛЬНАЯ ССЫЛКА НА СТАТЬЮ

Регистрация активности единичных молекул аспарагиназы с помощью нанопорового детектора / Иванов Ю. Д., Аблеев А. Н., Шумянцева В. В., Жданов Д. Д., Покровская М. В., Александрова С. С., Иванова И. А., Виноградова А. В., Неведрова Е. Д., Зиборов В. С., Ваулин Н. В., Лебедев Д. В., Букатин А. С., Мухин И. С., Арчаков А. И. // Вестник Государственного университета просвещения. Серия: Физика-Математика. 2024. № 1. С. 20–32.

DOI: 10.18384/2949-5067-2024-1-20-32.

FOR CITATION

Yu. D. Ivanov, A. N. Ableev, V. V. Shumyantseva, D. D. Zhdanov, M. V. Pokrovskaya, S. S. Aleksandrova, I. A. Ivanova, Vinogradova A. E., E. D. Nevedrova, V. S. Ziborov, N. V. Vaulin, D. V. Lebedev, A. S. Bukatin, I. S. Mukhin, A. I. Archakov. Registration of asparaginase single molecule activity using a nanopore detector. In: *Bulletin of Federal State University of Education. Series: Physics and Mathematics*, 2024, no. 1, pp. 20–32.

DOI: 10.18384/2949-5067-2024-1-20-32.