КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени В.И.УЛЬЯНОВА-ЛЕНИНА

Химический институт им.А.М.Бутлерова

Кафедра аналитической химии

ОСНОВЫ БИОСЕНСОРИКИ

Г.А.Евтюгин, Г.К.Будников, Е.Е.Стойкова

(учебное пособие)

Казань - 2007

УДК 543.9
ББК 24.4
Е26

Печатается по решению Научно-методического совета Химического института им.А.М.Бутлерова Казанского государственного университета

Рецензент: доктор химических наук, профессор Бабкина С.С.

Е26 **Основы биосенсорики** / Г.А. Евтюгин, Г.К. Будников, Е.Е. Стойкова.- Казань, Казанский государственный университет им.В.И. Ульянова-Ленина, 2007.- 80 с.

Учебное пособие к курсу "Основы биосенсорики" для студентов 4 курса дневной формы обучения Химического института им.А.М.Бутлерова, специальность "Химия". Рассмотрены вопросы функционирования биосенсоров на основе различных преобразователей сигнала, включения в их состав биологических компонентов, а также способы регистрации аналитического сигнала. Приведены примеры практического использования биосенсоров в эколого-аналитическом контроле, медицине и биотехнологии.

© Евтюгин Г.А., Будников Г.К., Стойкова Е.Е.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4
Глава 1. Общие принципы функционирования биосенсоров 5
Вопросы для самопроверки и углубленного изучения к главе 1 11
Глава 2. Включение биологического компонента в состав биосенсора 11
2.1. Методы нековалентной иммобилизации 12
2.2. Ковалентная иммобилизация 18
2.3. Иммобилизация микроорганизмов и надмолекулярных структур 21
Вопросы для самопроверки и углубленного изучения к главе 2 22
Глава 3. Преобразователи сигнала биосенсоров 23
3.1. Электрохимические методы 23
3.2. Другие преобразователи сигнала биосенсоров 28
Вопросы для самопроверки и углубленного изучения к главе 3 33
Глава 4. Ферментные сенсоры 33
4.1. Ферментные сенсоры в эколого-аналитическом контроле 38
4.2. Ферментные сенсоры в медицине 44
Вопросы для самопроверки и углубленного изучения к главе 4 49
Глава 5. ДНК-сенсоры 50
5.1. Определение гибридизационных взаимодействий 53
5.2. Определение низкомолекулярных соединений 64
5.3. ДНК-повреждающие факторы и загрязнители окружающей среды 70
5.4. Коммерциализация ДНК-сенсоров. ДНК-чипы и батареи сенсоров 72
Вопросы для самопроверки и углубленного изучения к главе 5 73
Глава 6. Микробные сенсоры 73
6.1. Электрохимические микробные сенсоры 74
6.2. Микробные оптосенсоры 77
Вопросы для самопроверки и углубленного изучения к главе 6 78
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 79
Литература 80

ВВЕДЕНИЕ

Химические и биохимические сенсоры относятся к числу направлений, определяющих развитие современной аналитической химии. Основным отличием сенсорных технологий от традиционных подходов инструментального анализа является их ориентация на получение конечного продукта – сенсора, позволяющего проводить качественный или количественный анализ в реальном масштабе времени и с минимальной дополнительной пробоподготовкой. Как правило, химические сенсоры имеют аналоги среди традиционных инструментальных методов анализа, однако в них процессы химического превращения определяемого вещества и измерения сигнала совмещены во времени и пространстве. Это позволяет использовать химические сенсоры в тех областях контроля, где требуется быстрое получение предварительной объективной информации о химическом составе анализируемого объекта – в производстве, оценке качества продуктов питания, эколого-аналитическом контроле и т.д.

Биосенсоры рассматривают как один из вариантов химических сенсоров, отличающийся тем, что в качестве рецепторов, обеспечивающих формирование аналитического сигнала, в них используют биохимические (биологические) компоненты. В 2003 году суммарный мировой рынок продаж биосенсоров составил 7.2 млрд. долларов США с прогнозом ежегодного прироста на 10-14% в течение последующих восьми лет. Биосенсорные технологии активно применяются в молекулярной биологии и биохимии, в том числе, при расшифровке генома человека. Смычка биосенсоров с нанотехнологиями привела к созданию миниатюрных многофункциональных сенсоров – биочипов, прототипов биологического компьютера и нанороботов. Актуальность биосенсорики как нового высокотехнологичного и интеллектуального направления развития науки и технологии на стыке химии, биологии и медицины подтверждена включением биосенсоров в список критических технологий РФ, утвержденных на период до 2009 г.

Вышесказанное определяет важность подготовки современных специалистов в области биосенсорики. В пособии рассмотрены общие вопросы функционирования биосенсоров, включения в их состав биологических компонентов, а также регистрации аналитического сигнала. Приведены примеры практического использования биосенсоров в эколого-аналитическом контроле, медицине и биотехнологии. Пособие предназначено для студентов старших курсов химических специальностей университетов, аспирантов и специалистов, работающих в области биоанализа и биосенсорики.

Глава 1. Общие принципы функционирования биосенсоров

- ***Биосенсоры*** - аналитические устройства, в состав которых входят биохимические элементы, реагирующие с определяемыми веществами и находящиеся в непосредственном контакте с трансдьюсером (датчиком), преобразующим в итоге биохимический сигнал в электрический.

Данное определение ИЮПАК устанавливает единство места и времени биохимического распознавания и регистрации аналитического сигнала. В том случае, когда биохимический компонент пространственно отделен от преобразователя сигнала, правильнее говорить о ***биосенсорном устройстве***, хотя в современной литературе этих рекомендаций ИЮПАК придерживаются не строго.

- ***Трансдьюсер*** - датчик (сенсор, дословно - преобразователь сигнала), превращающий биохимический сигнал с участием биологического компонента биосенсора в электрический. Это может быть электрод, оптоволокно, пьезокристалл и т.д.

Для получения сигнала биосенсора используют самые разнообразные принципы измерения - оптические, пьезоэлектрические, акустические и т.д. Наиболышую долю - до 80 % всех биосенсоров - составляют электрохимические биосенсоры. Их называют также в соответствии с природой биохимического компонента - ***ферментные электроды, иммуносенсоры*** и ***ДНК-сенсоры***.

Принципы регистрации сигнала в биосенсорике не отличаются от используемых при создании химических сенсоров на основе традиционных компонентов. Например, электрохимические биосенсоры используют явление электрокатализа, оптосенсоры - люминесценцию, физические биосенсоры - пьезоэффект и распространение поверхностных акустических волн. Тем не менее, биохимическая природа распознавания и характер взаимодействия биологических компонентов и трансдьюсера настолько своеобразны и специфичны, что в ряде случаев в процессе создания биосенсоров появились совершенно новые датчики, самостоятельно в других видах анализа практически не используемые. Например, импедиметрические сенсоры регистрируют изменение импеданса поверхностного слоя, биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса - рассеяние энергии светового потока при его полном внутреннем отражении.

Общая схема функционирования биосенсора представлена на рис.1. Биохимический компонент выступает как высокоселективный сорбент, удерживая на поверхности определяемый компонент. Трансдьюсер выполняет функцию механической поддержки биохимического компонента, одновременно регистрируя сигнал о биохимическом превращении.

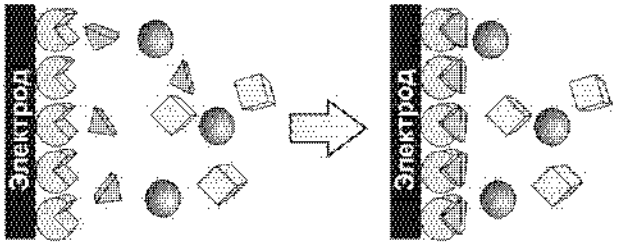


Рисунок 1. Схема функционирования биосенсора

Предпосылки создания биосенсоров появились достаточно давно. В 1916 г. появилась первая публикация по иммобилизации фермента: был получен препарат инвертазы на древесном угле. В 1922 г. появился первый универсальный преобразователь сигнала, стеклянный pH-метрический электрод, впоследствии составивший основу самых различных потенциометрических биосенсоров. В 1956 г. Кларк предложил конструкцию кислородного электрода на основе платины, покрытой газопроницаемой мембраной, а впоследствии (1962 г.) использовал его в сочетании с глюкозооксидазой для измерения содержания глюкозы в крови. Как и во многих других прикладных областях анализа, определяющим фактором развития биосенсоров стал платежеспособный потребитель - медицина, испытывавшая острый дефицит в простых и надежных средствах биохимического контроля. Через 14 лет после появления лабораторного прототипа компания Yellow Springs Instruments создает коммерческий глюкозный биосенсор. До настоящего времени биосенсоры медицинского назначения составляют большую часть коммерческого рынка биосенсоров. Помимо глюкозы, медицинские биосенсоры применяют для определения мочевины, молочной и мочевой кислоты, глицеридов жирных кислот, аминокислот, фосфатидилхолинов, ряда других важных метаболитов. Биосенсоры также находят применение в микробиологической промышленности, эколого-аналитическом контроле, биотехнологии, контроле пищевых продуктов, в решении теоретических и прикладных задач химии белков и нуклеиновых кислот и т.д. Биосенсорные технологии активно применялись при расшифровке генома человека и в поиске новых противораковых лекарственных препаратов.

Классификация биосенсоров. Существует много принципов классификации биосенсоров, исходящих из природы биохимического компонента, преобразователя сигнала, аналитических задач, особенностей

генерируемого сигнала и областей потенциального применения. Наиболее важные классификации приведены на рис.2. Чаще всего биосенсоры называют в соответствии с природой биохимического компонента.

Рисунок 2. Классификация биосенсоров в соответствии с различными классифицирующими признаками

- ***Ферментные сенсоры*** включают чистые препараты фермента или биологические препараты (гомогенаты тканей или микробных культур), проявляющие определенную биологическую активность. В соответствии с назначением ферментные сенсоры подразделяют на субстратные и ингибиторные. Субстратные биосенсоры предназначены для определения специфических субстратов ферментативных реакций. Примером может служить определение глюкозы с помощью ферментного сенсора на основе глюкозооксидазы или мочевины с помощью уреазного сенсора. Название фермента часто включают в название биосенсора. Ингибиторные сенсоры предназначены для определения веществ, снижающих активность фермента. Пример - определение фосфорорганических пестицидов, снижающих активность гидролиза ацетилхолина, катализируемого ферментом ацетилхолинэстеразой.
- В ***иммуносенсорах*** в качестве биохимического рецептора используют иммуноглобулины - защитные белки, выделяемые иммунной системой организма в ответ на поступление чужеродных биологических соединений (антигенов). Иммуноглобулины, называемые антителами, образуют прочные комплексы с антигенами. Иммуносенсоры используют для определения компонентов иммунохимического взаимодействия - антител или антигена.

Присутствие антител в крови служит диагностическим признаком инфекции или токсического воздействия определенных веществ.

Определение антигенов можно производить не только в биологических жидкостях, но и в других средах, включая окружающую природную среду. При наличии специфических антител иммуносенсоры могут определять практически любое соединение с высокой специфичностью и селективностью.

- ***ДНК-сенсоры*** включают в качестве биохимического компонента нуклеиновые кислоты (ДНК). Чаще всего это не природные компоненты, выделенные из живого организма, а их фрагменты, называемые также ДНК-зондами или ДНК-праймерами. Их подбирают таким образом, чтобы они отражали специфичность строения ДНК в целом. ДНК-зонды синтезируют в процедурах ДНК-амплификации на основе полимеразной цепной реакции. Их могут дополнительно модифицировать, чтобы повысить устойчивость или облегчить включение в состав биосенсора. Также в составе ДНК-сенсоров используют синтетические олигонуклеотидные последовательности, не имеющие природного аналога, а подобранные в соответствии со способностью взаимодействовать с определенными биомолекулами. Такие синтетические нуклеиновые рецепторы получили название аптамеры (рис.3).

Вторая задача ДНК-сенсоров - выявление белков и низкомолекулярных соединений, специфически взаимодействующих с определенными участками ДНК. К ним относятся регуляторные белки, маркеры онкологических заболеваний, соединения, повреждающие ДНК, многие лекарственные препараты противоракового действия. По специфичности связывания аптамеры приближаются к антителам, а по устойчивости даже превосходят их. ДНК-сенсоры на основе аптамеров называют также ***аптасенсорами***. ДНК-сенсоры используют для установления последовательности нуклеотидов целевой молекулы ДНК, комплементарной зонду. Это позволяет не только надежно диагностировать патогенные микроорганизмы и вирусы, но и решать задачи тонкой генетической диагностики. Например, это установление отцовства, выявление генетических заболеваний, определение присутствия продуктов из генетически модифицированных организмов и т.д.

Рисунок 3. Аптамер для селективного определения цианокоболамина

▪ ***Микробные биосенсоры*** чаще всего представляют собой биосенсорные устройства, в которых биологический компонент пространственно отделен от регистрирующего устройства. Это связано с тем, что реакции микроорганизмов на изменение химического состава среды достаточно медленны по сравнению с реакциями ферментов или антител, поскольку опосредованы стадиями переноса веществ через биологические мембраны. Поэтому приходится создавать более высокую концентрацию живых клеток, чем позволяет геометрия трансдьюсера. Это могут быть биологические реакторы колоночного или мембранного типа или суспензии микроорганизмов в растворе, в который опущен датчик. Используемые в них микроорганизмы могут выполнять различные функции. Они могут осуществлять превращение определяемого вещества с помощью ферментов, выделяемых в процессе жизнедеятельности в культуральную среду или остающихся внутри живых клеток. Такие сенсоры напоминают ферментные сенсоры за тем исключением, что в превращении субстрата могут участвовать не один, а совокупность ферментов. Чаще всего речь идет о реакциях окисления, которые измеряют по скорости потребления кислорода или выделения углекислого газа. Такие микробные сенсоры называют также респираторными. Их применяют для определения суммарного количества окисляющихся органических соединений, например, в сточных водах. Соответствующий параметр аналогичен гидрохимическим показателям биохимического потребления кислорода и содержания органического углерода в природных или сточных водах. Кроме того, респираторные микробные сенсоры можно использовать для определения токсических веществ антимикробного действия, подавляющих процессы микробного дыхания.

Реакции микробного окисления малоселективны, поскольку в отличие от индивидуальных ферментов одноклеточные организмы способны разлагать различные органические вещества с близкой эффективностью. Генная инженерия позволяет создать микроорганизмы для направленной продукции определенных ферментов, активность которых можно

определять аналогично ферментным сенсорам. Таким образом, например, можно повысить стабильность ферментов и увеличить их концентрацию, если речь идет о малоустойчивых белках. К числу наиболее известных примеров таких сенсоров относятся системы определения токсических веществ, основанные на подавлении активности люциферазы - микробиального фермента, генерирующего люминесценцию в процессе окисления некоторых субстратов.

Вторая область применения микробных сенсоров - определение влияния веществ на клетку как модель многоклеточного организма. Такие биосенсоры применяют в токсикологических исследованиях при оценке среднесмертельной концентрации токсикантов, при поиске индивидуальных доз антибиотиков, антимикробных и противогрибковых добавок к краскам и отделочным материалам. Наконец, микробные биосенсоры используют для оценки состояния природных сообществ микроорганизмов, например, для контроля работы биологических очистных сооружений.

- ***Биосенсоры на основе надмолекулярных структур клетки*** занимают промежуточное положение между ферментными и ДНК-сенсорами и микробными сенсорами, поскольку в их составе применяют внутриклеточные структуры, имеющие достаточно сложное иерархическое строение. Это могут быть липидные мембраны со встроенными рецепторами, органеллы клеток (митохондрии или хлоропласты), полиферментные комплексы и т.д. Пока такие биосенсоры не нашли широкого применения, поскольку их биологические компоненты, извлеченные из привычного окружения, недостаточно устойчивы для того, чтобы сохранять операционные параметры сенсоров в течение длительного срока. Их используют для изучения биохимических процессов, например, для подтверждения механизма токсического действия загрязнителей или для выявления пути передачи нервного импульса или иного биохимического сигнала от рецептора. К числу таких биосенсоров относят, например, сенсоры для оценки фитотоксичности, включающие компоненты фотосинтезирующего аппарата клеток растений.

Независимо от природы биохимического компонента все биосенсоры можно разделить на две группы по ***характеру сигнала***. Первые представлены ферментными сенсорами. В них измерение сигнала сопровождается изменением природы определяемого вещества. Сам сигнал является мерой скорости ферментативной реакции превращения субстрата. Убыль субстрата компенсируется его диффузионным переносом из объема раствора, поэтому по мере расходования субстрата сигнал ферментного сенсора должен снижаться. Однако степень превращения субстрата за время измерения обычно весьма невелика, поэтому в стационарных условиях

сигнал ферментного сенсора стабилен. Его зависимость от объемной концентрации субстрата в целом носит сигмоидный характер, но в достаточно широком диапазоне концентраций апроксимируется линейной функцией. Такие сенсоры называют также кинетическими, или динамическими.

Вторую группу составляют биохимические сенсоры, в которых в результате биохимического распознавания устанавливается равновесие, не сопровождающееся химическим превращением определяемого вещества. Такие биосенсоры называют аффинными биосенсорами. К ним относят иммуно-, ДНК-сенсоры и сенсоры на основе надмолекулярных клеточных структур. Максимальное значение сигнала аффинных биосенсоров соответствует установлению равновесия взаимодействия рецептора и определяемого вещества и определяется соответствующей константой равновесия.

В соответствии с принятой трактовкой термина "биосенсор" все изменения состава, так же, как и процесс биохимического распознавания, происходят в поверхностном слое, объем которого пренебрежимо мал по сравнению с объемом анализируемого раствора.

Вопросы для самопроверки и углубленного изучения к главе 1.

1. Что такое биосенсор? Дайте определение и приведите примеры. В чем отличие биосенсора от биосенсорного устройства?
2. В чем состоят преимущества и недостатки реакторных биосенсорных устройств по сравнению с мембранными (пленочными) биосенсорами?
3. Что представляет собой трансдьюсер и какова его роль в биосенсоре? Приведите примеры наиболее распространенных трансдьюсеров в биосенсорике.
4. Каковы принципы классификации биосенсоров?
5. На какие группы подразделяют биосенсоры по биохимическому компоненту? Дайте краткие характеристики биохимических компонентов с точки зрения их использования в составе биосенсора.
6. На какие группы подразделяют биосенсоры по характеру сигнала? В чем, на ваш взгляд, преимущества и недостатки динамически и статических сигналов биосенсора?
7. Каковы, на ваш взгляд, возможные проблемы миниатюризации биосенсоров? С чем связан интерес к миниатюризации биоаналитическх устройств?

Глава 2. Включение биологического компонента в состав биосенсора

Как следует из определения биосенсора, для его создания требуется закрепить биологический компонент на поверхности преобразователя сигнала. Эту стадию называют иммобилизацией биологического компонента.

- ***Иммобилизация*** - перевод биополимера (ферментов, антител, олигонуклеотидов, нуклеиновых кислот) в нерастворимую форму путем включения в состав инертного носителя или в результате физического или химического связывания на поверхности преобразователя сигнала.

Это ключевой этап создания биосенсора, от его успеха зависит сама возможность измерения сигнала, операционные характеристики биосенсора, чувствительность и селективность определения биологической мишени в матрицах сложного состава.

Все методы иммобилизации можно разделить на следующие группы:

- *Физическая (нековалентная) иммобилизация*, не предполагающая образования прочных ковалентных связей между биополимером и носителем (трансдьюсером). К данной группе способов иммобилизации относятся:
  - адсорбция биологического компонента на материале электрода или инертном носителе;
  - включение в состав инертного полимера, образующегося в результате полимеризации (поликонденсации) или осаждаемого из органического растворителя в присутствии биологического компонента;
  - аффинные методы, в которых иммобилизация осуществляется за счет многоточечного связывания определенных фрагментов биополимеров с высокоселективными рецепторами естественного или искусственного происхождения.
- *Ковалентная иммобилизация*, предполагающая образование одной или нескольких ковалентных связей между функциональными группами носителя и биологического компонента. В ковалентной иммобилизации также выделяют *кросс-сшивку* биополимеров между собой или с носителем бифункциональными сшивающими реагентами.

Выбор способа иммобилизации делают, исходя из критериев стабильности иммобилизованного препарата, его доступности для реакции с определяемым веществом, способа регистрации аналитического сигнала.

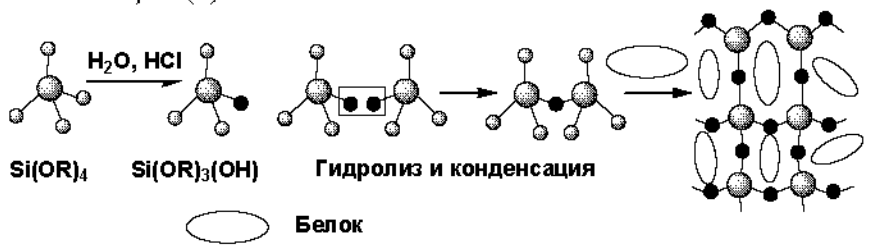
2.1. Методы нековалентной иммобилизации

Такие методы просты в исполнении и считаются щадящими по отношению к биологическим компонентам.

- В случае *адсорбции* биополимер удерживается на инертном носителе или трансдьюсере за счет электростатических, ван-дер-ваальсовых, ионных и водородных взаимодействий, которые достаточно слабы, но множественны и обеспечивают относительно прочное связывание биомолекулы. В случае иммобилизации клеточных культур сорбционное удерживание клеток на поверхности специально подготовленных полимерных материалов бывает настолько сильным, что удаление клеток с поверхности полимера сопровождается их лизисом. Результат сорбционной иммобилизации во многом определяется свойствами поверхности - ее зарядом, наличием полярных групп, величиной редокс-потенциала, энергетической однородностью и т.д. Адсорбция обычно не позволяет достичь высокой поверхностной концентрации биологических компонентов. Биополимеры, как правило, несут определенный заряд и электростатически "выдавливают" избыток одноименно заряженных биомолекул с поверхности сенсора. Предварительная обработка поверхности носителя или трансдьюсера с целью получения (внесения) заряженных или полярных групп способствует адсорбции биополимеров. С этой целью используют различные методы окисления, модификации полимерами или функционализирующими реагентами. Так, окисление золотых или углеродных электродов повышает их емкость в отношении белков, нуклеиновых кислот и микроорганизмов. Для стекла с этой же целью применяют силанизирующие реагенты (галогенсиланы, силоксаны и т.д.). Перспективно применение оксида циркония (IV), образующего ионные комплексы с эфирами фосфорной кислоты (в том числе, с олигонуклеотидами ДНК-зонда) и неорганическими фосфатами. Последовательная обработка указанными реагентами может привести как к монослойному, так и полислойному заполнению поверхности. Недостатком сорбционной иммобилизации является небольшое время жизни биосенсора (обычно несколько суток, реже недель). Скорость вымывания биополимера можно замедлить, если использовать дополнительные покровные мембраны или сочетать адсорбцию с последующей ковалентной сшивкой или включением биополимеров в полимерные пленки.

- Мягким способом нековалентной иммобилизации является *физический захват* биологического материала в формирующуюся полимерную матрицу. Полимер можно осаждать из органического растворителя путем его разбавления водой или из микроэмульсии при высушивании на поверхности сенсора. Его можно также получить гелеобразованием, например, из растворов желатина, агара,

полиакриламида, альгината, или путем поликонденсации ряда органических эфиров и хлорангидридов. Последний вариант получил название *золь-гель иммобилизации* (1).



(1)

Отсутствие ковалентных связей между биологическим компонентом и носителем и благоприятное гидрофильное микроокружение, характерные для продуктов иммобилизации в гидрофильных полимерах, помогают сохранить активность иммобилизованных биологических препаратов, особенно при их использовании в органических растворителях.

Гидрофильные носители различной природы, в том числе, промышленно выпускаемые (сефадекс, гидрогели поливинилпирролидона, фотополимеризуемые носители Eastman Kodak и др.) часто при контакте с водой увеличивают свой объем. Набухание носителя может сопровождаться частичным вымыванием биополимера в раствор. Указанные недостатки можно частично преодолеть обработкой гидрогелей бифункциональными реагентами. Формируются сетчатые трехмерные структуры, более жесткие и содержащие меньшие количества воды по сравнению с исходными гидрогелями.

◘ Другим вариантом нековалентной иммобилизации в полимерном носителе является захват биологического компонента в растущую пленку полимера, формируемую на поверхности электрода в процессе электролиза. *Электрополимеризация* - простая и быстрая процедура, которая позволяет контролировать толщину получаемого биочувствительного слоя по величине тока или пропущенного количества электричества. Она легко поддается автоматизации при массовом производстве и обеспечивает требуемые метрологические характеристики свойств образующегося покрытия. В зависимости от способа проведения электрополимеризации биологические компоненты могут располагаться под слоем полимера, во всем его объеме или на поверхности (рис.4). В последнем случае процесс адсорбции можно проводить при условиях, отличающихся от условий электрополимеризации. Это позволяет уменьшить потери биологического препарата, поскольку электрополимеризацию часто проводят в присутствии сильных минеральных кислот, оказывающих денатурирующее действие на белки и нуклеиновые кислоты.

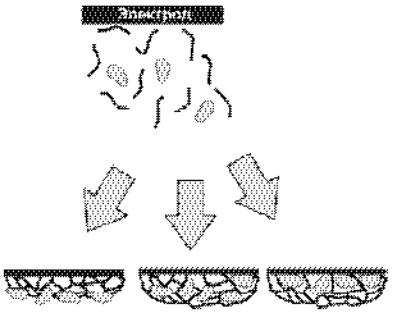


Рисунок 4. Включение биологических компонентов в пленку полимера в процессе электрополимеризации: механическое покрытие адсорбированных биомолекул, их равномерное распределение в пленке полимера и адсорбция на полимерном покрытии

Иммобилизацию белков и нуклеиновых кислот проводят в полимерах *о-* и *м*-фенилендиамина, *п*-аминофенола, аллиламина, тионина, других фенотиазиновых и феноксазиновых красителей, производных пиррола, тиофена и анилина. Некоторые продукты полимеризации, например, производных анилина, пиррола и тиофена, обладают электропроводностью и электрохимической активностью, что можно использовать для генерирования сигнала биосенсора. Таким образом, например, можно регистрировать активность оксидоредуктаз, а также измерять содержание электрохимически активных соединений, взаимодействующих с ДНК или белками.

- Включение в *полиионные комплексы*. Их получают путем взаимодействия высокомолекулярных полиэлектролитов - поликатионов (полианилин, политионин, политиофен) и полианионов (нафион, полистиролсульфонат, поливинилсульфонат). Включение биомолекул происходит в процессе формирования комплексов при послойном осаждении полиэлектролитов из раствора. Такие многослойные покрытия отличаются высокой емкостью и дополнительно создают электростатический барьер, ограничивающий доступ к электроду мешающих ионов матрицы пробы. Естественное микроокружение фермента сохраняется в *синтетических липидных мембранах (пленках Ленгмюра-Блодже)*, по составу и свойствам близких к природным биологическим мембранам. Их используют в качестве модели при изучении мембранных процессов, а также для иммобилизации белков и нуклеиновых кислот. Поскольку сами пленки Ленгмюра-Блодже обладают низкой механической устойчивостью, их наносят на поверхность инертных гидрофобных полимеров (поливинилхлорид, тефлон), получая т.н. импрегнированные мембраны, или непосредственно на преобразователь сигнала. Ориентация биологических компонентов в таких искусственных липидных мембранах может отличаться от ориентации биокомпонентов, адсорбированных на твердой поверхности. Это способствует, например, проведению

сопряженных реакций превращения субстратов в полиферментных или окислительно-восстановительных реакциях.

- *Самоорганизующиеся слои* (SAM - self-assembled monolayers) отличаются от пленок Ленгмюра-Блоджде более прочным контактом с носителем. Их получают на поверхности золотых электродов непосредственно из растворов тиолсодержащих реагентов. Меркаптаны с длинными углеводородными радикалами в результате образования тиольных связей с золотом и гидрофобных взаимодействий формируют высокорегулярные структуры, в которых углеводородные радикалы располагаются ортогонально к поверхности электрода, образуя локальную гидрофобную область, способную включать различные неполярные соединения (рис.5). Самоорганизующиеся слои можно использовать как матрицу для включения биополимеров и гидрофобных низкомолекулярных соединений. Их также модифицируют, вводя в гидрофобные участки функциональные группы для последующей ковалентной или нековалентной сшивки. В качестве примера на рис.6 показан способ точечной модификации такого слоя с целью введения молекул белка.

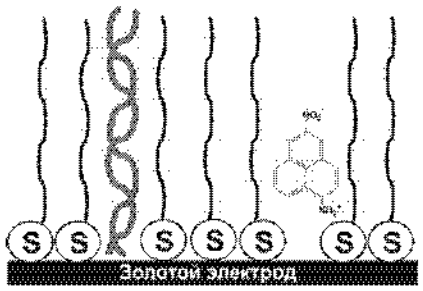


Рисунок 5. Самоорганизующийся слой на золотом электроде, образованный путем самосборки тиолированных длинноцепочечных органических кислот. Схематично показано включение ДНК и низкомолекулярных соединений, S - тиольная группа

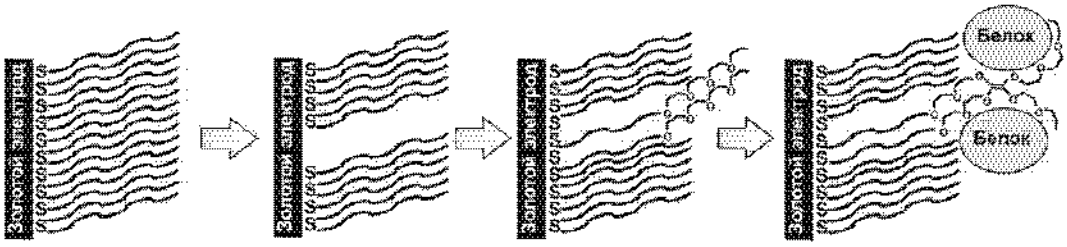
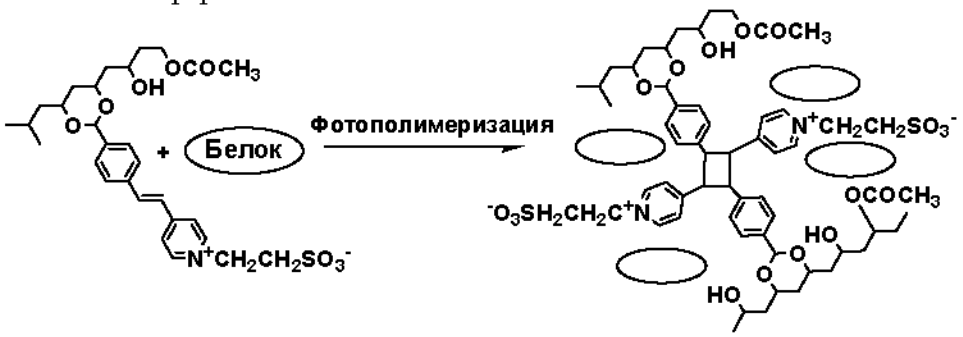


Рисунок 6. Иммобилизация белка в самоорганизующемся слое. УФ облучение через шаблон разрушает связи Au-S; в образующиеся поры включают производные полиэтиленгликоля с концевыми тиольными группами; на свободных участках проводят иммобилизацию белка на полиэтиленгликольных фрагментах слоя

- *Фотополимеризуемые слои* получают, нанося на носитель гомогенную смесь мономеров и биологического компонента и подвергая ее УФ-облучению. Такая процедура оказывает меньшее денатурирующее действие на биологический компонент по сравнению с химическим инициированием той же реакции. В качестве примера на схеме (2) показана иммобилизация фермента холинэстеразы путем захвата в фотополимеризуемый замещенный поливиниловый спирт с пиридиниевыми заместителями с сульфонатными группами.
- *Микрокапсулирование и двойное эмульгирование* - варианты физического включения биологических компонентов в состав полимерной матрицы, в котором предварительно получают прямую или обратную эмульсию растворов полимера в органическом растворителе и биологического компонента - в воде. После высушивания получают мембрану, в которой полимерный носитель содержит микрокапсулы воды, содержащей биомолекулы и низкомолекулярные ионы электролитов. В отличие от прямого включения в полимер данный способ иммобилизации позволяет сохранить гидрофильное окружение биополимера на всех стадиях иммобилизации, что позволяет достичь достаточно высокой остаточной активности фермента.



(2)

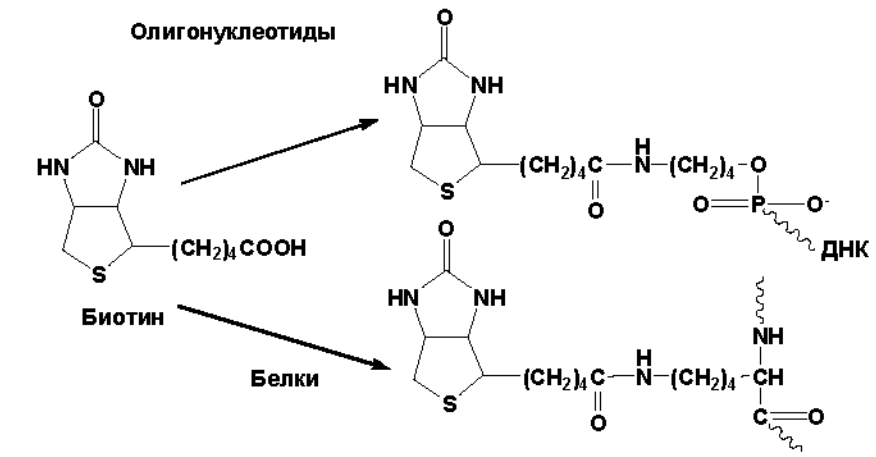
- *Аффинная иммобилизация* – относительно новое направление в создании биосенсоров. В ней используют специфические взаимодействия между определенными рецепторными участками природных биохимических компонентов. Несмотря на обратимый характер таких взаимодействий, называемых аффинными, прочность связывания, а главное, специфичность взаимодействия обеспечивают надежное пространственно ориентированное закрепление биокомпонентов на поверхности преобразователя сигнала.

Одним из наиболее распространенных способов аффинной иммобилизации является авидин-биотиновое связывание. Образуется прочный комплекс природного амина биотина с белками авидином или стрептавидином (константа связывания $\sim 10^{15}$ M^{-1}). Белковая часть комплекса имеет четыре потенциальных центра связывания биотина, что

позволяет использовать его в качестве своеобразного мостика для образования достаточно сложных надмолекулярных структур. Обычно биотин ковалентно пришивают к нерастворимому носителю, далее обрабатывают авидином (стрептавидином), после чего образующийся нерастворимый комплекс отмывают от избытка белка и обрабатывают биотинированным биополимером. Имеются коммерческие мембраны и носители, а также препараты ферментов, используемых в иммуноанализе, уже содержащие в составе биотин. В качестве примера на схеме (3) показано использование данного приема для иммобилизации олигонуклеотидов и белков. Метод авидин-биотинового связывания сочетают с другими способами иммобилизации. Например, пирролсодержащие производные биотина дают в результате электрополимеризации пленки, удерживающие через авидиновый мостик различные биотинированные белки, в том числе и ферменты (рис.7).

Достоинством такого подхода является универсальность способа функционализации: используя один протокол полимеризации, можно получать различные биосенсоры, варьируя биотинированный компонент. Аффинная иммобилизация использует и другие белок-специфичные взаимодействия. Так, конканавалин (лектин, выделяемый из некоторых бобовых) специфически связывается с маннозными остатками ферментов. Микробиальный белок - протеин А - прочно связывает иммуноглобулины G. Коньюгаты антител и ферментов применяют для иммобилизации последних на носителях, модифицированных антигенами.

Данные подходы, получившие развитие из стандартных приемов иммуноферментного анализа, позволяют модифицировать трансдьюсер сразу несколькими ферментами или наоборот, получать на носителе локальные домены с иммобилизованными антителами против различных антигенов. Это открывает возможности создания мультисенсорных устройств с общим протоколом измерения иммунного отклика.



(3)

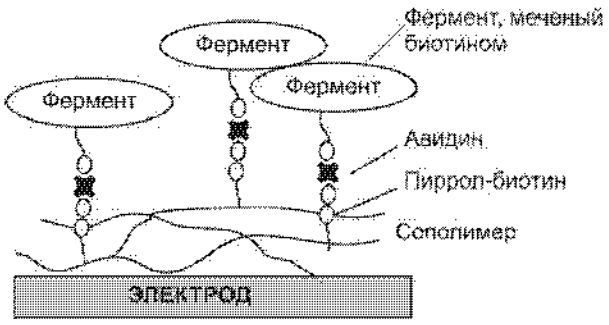


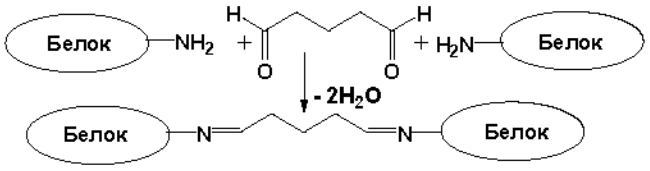
Рисунок 7. Иммобилизация ферментов с помощью авидин-биотинового связывания на электрополимеризованном покрытии

2.2. Ковалентная иммобилизация

Образование ковалентных связей между молекулами биополимера и нерастворимым носителем, в т.ч. преобразователем сигнала биосенсора, позволяет достичь наибольшей устойчивости иммобилизованного компонента. В отличие от приведенных выше вариантов физической сорбции ковалентная иммобилизация необратима. Это расширяет спектр условий, в которых сохраняется стабильный сигнал биосенсора и значительно увеличивает срок службы биосенсора.

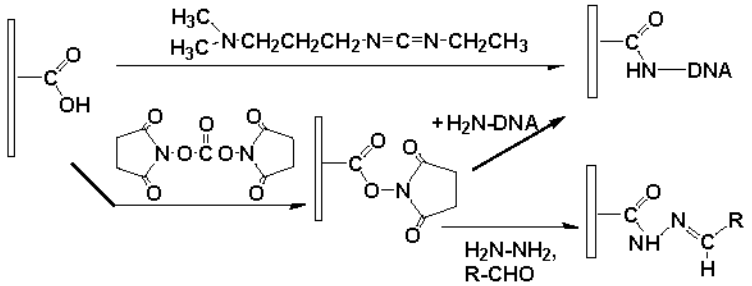
- *Кросс-сшивка* использует для иммобилизации т.н. бифункциональные реагенты. Они связывают молекулы биополимера между собой или со специально добавляемыми инертными белками. Кросс-сшивку можно проводить и без носителя, но чаще всего его подбирают таким образом, чтобы он также реагировал со сшивающим реагентом. Примером кросс-сшивки является действие глутарового альдегида, образующего основания Шиффа с амино-, гидроксильными и тиольными группами белков и нуклеиновых кислот (4). Реакция обратима, поэтому в некоторых случаях

рекомендуется химически восстанавливать >C=N- связи боргидридом натрия. Если реакцию проводить на полимерных мембранах из хитозана, других производных целлюлозы, аминированных углях, стекле, мембранах из активированного нейлона, то при обработке глутаровым альдегидом образуются ковалентные связи с поверхностными группами носителя, дополнительно препятствующие вымыванию биополимера в раствор. В качестве инертных белков, применяемых в кросс-сшивке, чаще всего применяют бычий сывороточный альбумин и желатин. Можно также использовать овальбумин или соевый ингибитор трипсина.



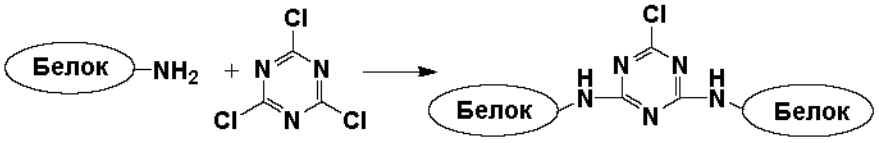
(4)

Вторым по значимости бифункциональным сшивающим реагентом являются карбодиимиды и N-гидроксисукцинимид (5). Они образуют более устойчивые связи, чем глутаровый альдегид, реагируют быстрее и не склонны к образованию олигомерных продуктов конденсации. В этой связи результаты иммобилизации более воспроизводимы.



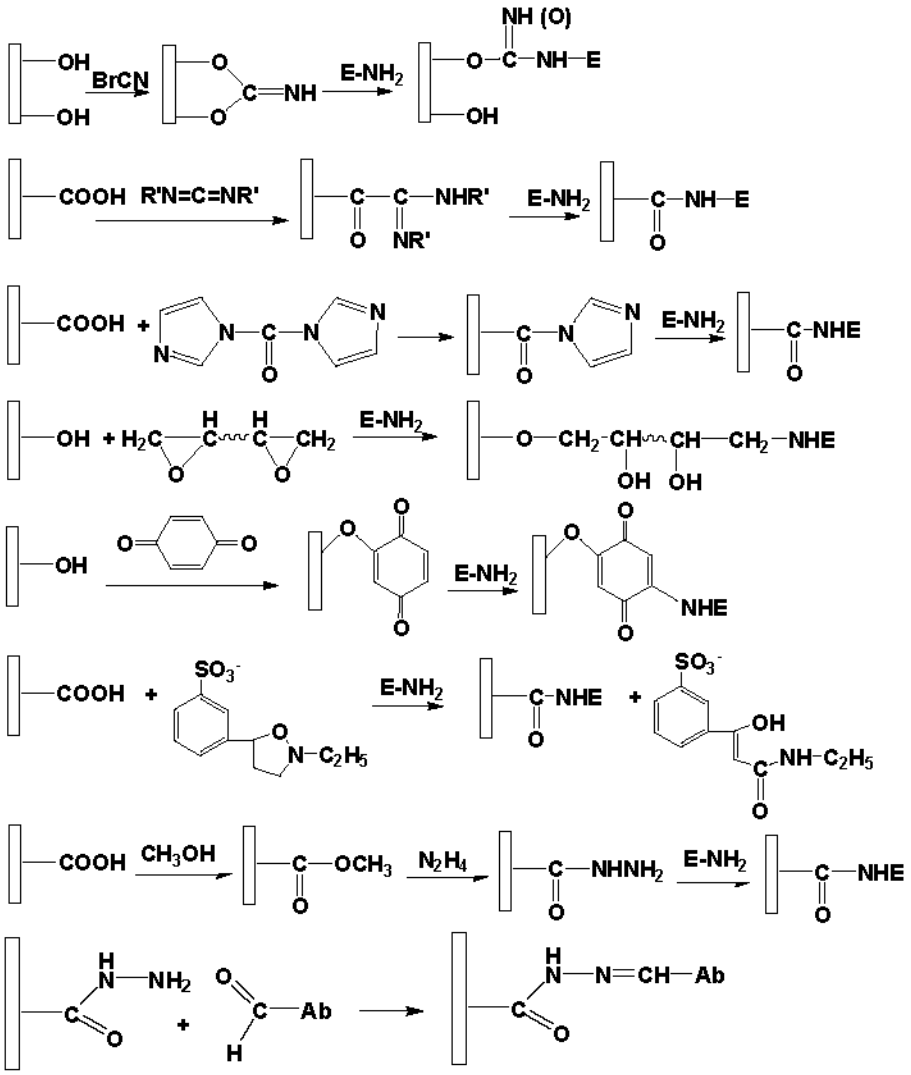
(5)

Кросс-сшивку осуществляют также хлористым циануром и его производными, при этом в реакции замещения участвуют один или два из трех атомов хлора кольца (6).



(6)

Некоторые другие способы ковалентной иммобилизации представлены на схеме (7). Для ковалентной иммобилизации используют также модификацию сахаридных остатков гликопротеинов. Окисление вицинальных гидроксидных групп сахаридов периодатом натрия приводит к образованию альдегидных групп, связывающихся с аминогруппами или гидразидными остатками модифицированных носителей (8).

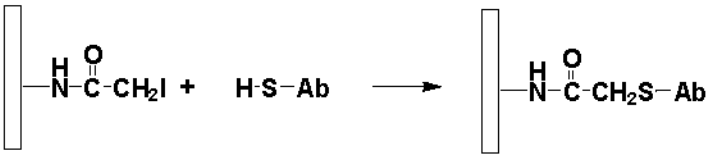


(7)

(8)

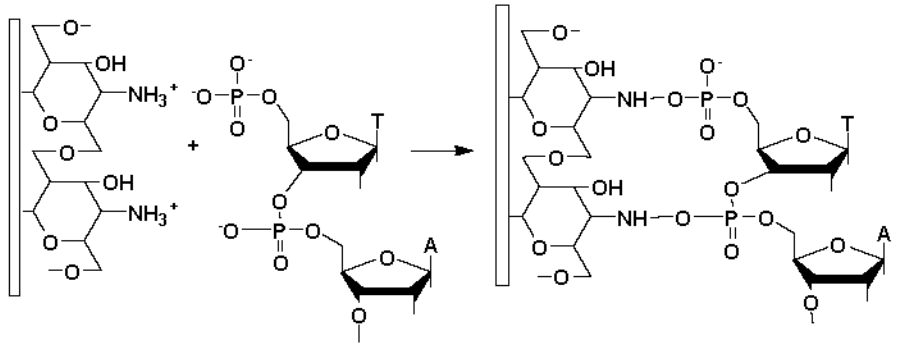
В случае иммобилизации антител окисление происходит по доменам тяжелых цепей иммуноглобулинов, не участвующих в связывании антигена. Таким образом, модификация не влияет на иммунохимические реакции иммобилизованных антител.

Другой способ иммобилизации антител - восстановление дисульфидных связей иммуноглобулинов 2-меркаптоэтиламином. При этом происходит диссоциация олигопептидных фрагментов. После этого проводят их связывание с носителем, активированным йодацетатом (9), или адсорбируют на золотом электроде путем образования связей Au-S .

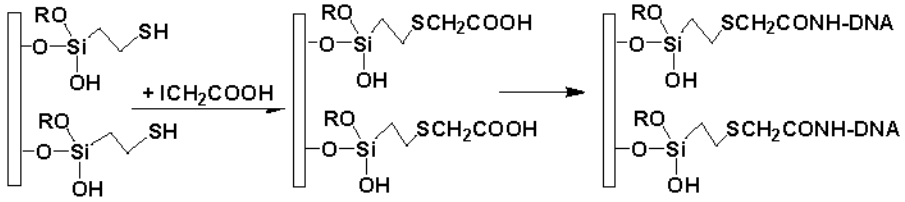


(9)

- *Ковалентную иммобилизацию ДНК и олигонуклеотидов* проводят, сшивая их хитозаном с образованием множественных амидных связей ((10), A и T обозначают нуклеотидные остатки тимина и аденина, соответственно). Разработаны методы ковалентной пришивки ДНК к аминодекстранам и силанизированным носителям (11).



(10)



(11)

Широко применяется модификация концевых нуклеотидных остатков. Так, включение в их состав тиольных групп позволяет за счет хемосорбции на золоте получить регулярные слои олигонуклеотидов, располагающихся преимущественно ортогонально к поверхности электрода.

2.3. Иммобилизация микроорганизмов и надмолекулярных структур

В составе микробных сенсоров используют, как правило, диализные мембраны или микрореакторы на основе пористых стекол, агарозы, керамических, полиакриламидных носителей с микроорганизмами, удерживаемыми на их поверхности и в порах в сорбированном виде. Для получения таких мембран и реакторов через них фильтруют суспензии клеток. Далее производится отмывка реактора от клеток, удерживаемых недостаточно прочно, обычно нежизнеспособных. В качестве мембранного

носителя могут также применяться элементы конструкции биосенсора, например, покровные полимерные мембраны. Прочность физической сорбции клеток настолько велика, что при отмывке происходит их частичный лизис.

Второй по распространенности метод - иммобилизация одноклеточных организмов путем их включения в гели на основе альгината кальция, коллагена, диатомитов и декстранов. Иммобилизация достигается путем суспендирования культуры клеток в растворе носителя с последующим желированием и формированием мембраны на гладкой поверхности (стекло, поверхность покровной мембраны преобразователя сигнала, сам электрод). Если включение в гель не обеспечивает постоянства характеристик мембраны (в результате набухания, частичного растворения и т.д.), ее можно сочетать с последующей обработкой глутаровым альдегидом или другими сшивающими реактивами, упомянутыми выше.

Рецепторные структуры и биологические мембраны иммобилизуют с помощью наиболее щадящих вариантов нековалентного связывания, исключающих изменение их пространственной структуры и нарушение целостности мембран. Наиболее подходят способы включения в гели и гидрофильные полимеры, получаемые по золь-гель технологии с участием органических ортосиликатов и галогенсиланов (см. реакцию (1)). Также используются гелевые составы на основе полиакриламидов, применяемые в электрофорезе. Рецепторные структуры и органеллы клетки включают в липидные пленки и самоорганизующиеся слои, в которых они удерживаются гидрофобными взаимодействиями.

Вопросы для самопроверки и углубленного изучения к главе 2

1. Что такое иммобилизация, в чем состоит принципиальное различие физической и химической (ковалентной) иммобилизации?
2. Каковы достоинства и недостатки физических и химических методов иммобилизации?
3. Как иммобилизуют ферменты, ДНК и микроорганизмы?
4. За счет каких функциональных групп биологического компонента образуются ковалентные связи с носителем и бифункциональным сшивающим реагентом ?
5. Каковы недостатки и преимущества метода адсорбции как способа иммобилизации? Каким образом можно устранить недостатки сорбционной иммобилизации?
6. Что такое кинетическое и диффузионное ограничение реакции иммобилизованного биологического компонента и как они могут влиять на аналитические характеристики биосенсора?

Глава 3. Преобразователи сигнала биосенсоров

В составе биосенсоров применяют различные преобразователи сигнала. Их классифицируют по способу генерирования, последующего преобразования и интерпретации сигнала.

3.1. Электрохимические методы

В биосенсорике широко применяют методы электроаналитической химии. Электроды составляют основу большинства коммерческих биосенсоров. Это связано с большим распространением соответствующих измерительных приборов, теоретической разработанностью электрохимических методов анализа и универсальностью электрохимических сенсоров, совместимых со многими биохимическими компонентами. В соответствии с принципами измерения различают потенциометрические и амперометрические (вольтамперометрические) сенсоры.

- *Потенциометрические биосенсоры* используют в составе ион-селективные электроды. Измеряемым сигналом служит потенциал, связанный с концентрацией потенциалопределяющего иона (12).

$$E = E_0 + \frac{0.059}{zF} \lg a \qquad (12)$$

Здесь E - потенциал ионоселективного электрода, E_0 - стандартный окислительно-восстановительный потенциал определяемого иона, z - число электронов, переносимых в электродной реакции, F - число Фарадея, a - активность определяемого иона. Селективность сигнала ионоселективного электрода достигается путем подбора специальной ионоселективной мембраны, содержащей ионофоры, селективно связывающие определяемые ионы. Например, в pH-метрическом электроде такой мембраной служит натриевое стекло, участвующее в реакции с ионами водорода. Некоторые типичные конструкции электродов представлены на рис.8.

Особо отметим ион-селективный полевой транзистор (англ. – ISFET, ion selective field effect transistor) - потенциометрический сенсор, созданный на основе полупроводниковых технологий. Это кремниевый элемент, в двух областях которого, называемых стоком и истоком, внедрены области n-проводимости. Энергетический барьер переноса электрона через разделяющую их область p-проводимости (затвор) высок, поэтому в отсутствие внешнего воздействия ток между стоком и истоком не протекает. Проводимостью области затвора можно управлять, если на нее нанести

мембрану, поляризующуюся в растворе определяемого иона. В случае pH-чувствительного полевого транзистора область затвора покрывают оксидом ванадия или тантала. Протонирование такого слоя "открывает" зону проводимости, в результате между стоком и истоком возникает электрический ток, величина которого пропорциональна pH раствора.

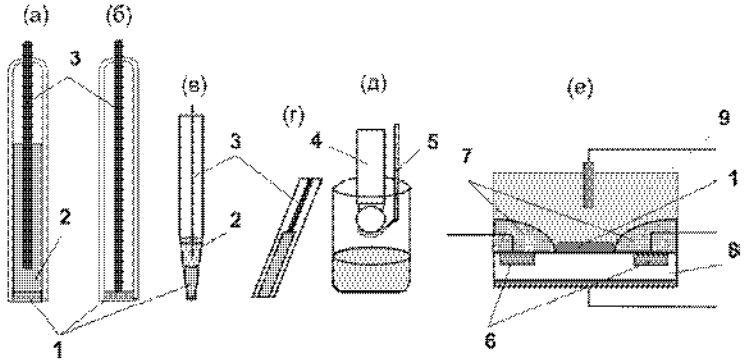


Рисунок 8. Конструкции ионоселективных электродов. Мембранный электрод с внутренним жидкостным (а) и твердым (б) контактом; микроэлектрод с жидкой мембраной (в); тонкопленочный электрод (г); электрод с газовым зазором (д); полевой транзистор (е). 1 - ионоселективная мембрана; 2 - внутренний раствор 3 - токосъемник; 4 - pH-метрический стеклянный электрод; 5 - солевой мостик; 6 - сток и исток; 7 - диоксид кремния; 8 - кремниевое основание; 9 - электрод сравнения

Применение ион-селективных электродов в составе биосенсоров связано, прежде всего, с регистрацией изменений pH, сопровождающих ферментативные реакции. Помимо гидролитических ферментов, таким образом можно исследовать поведение оксидоредуктаз, а также полиферментных комплексов с их участием (табл.1).

Обычно происходит подкисление ферментсодержащего слоя в силу выделения органических кислот. Уреаза и оксидазы аминокислот повышают pH в результате выделения аммиака (13).

$$NH_2\underset{\underset{O}{\|}}{C}NH_2 + H_2O \xrightarrow{уреаза} 2\,NH_3 + CO_2 \qquad (13)$$

- *Амперометрические преобразователи сигнала* регистрируют ток, возникающий при окислении или восстановлении компонентов биохимической реакции на электроде. Связь между величиной тока i и количеством вещества, участвующего в электродном процессе, определяется законом Фарадея (14),

$$i = nF\frac{dN}{dt} = nFSj \qquad (14)$$

где dN/dt - скорость окисления или восстановления, моль/с, S - площадь электрода и j - поток вещества на единицу площади поверхности.

Селективность измерения тока регулируют, определяя потенциал электрода в зависимости от природы окисляющегося или восстанавливающегося вещества.

Таблица 1. Ионоселективные электроды (ИСЭ) в составе ферментных сенсоров

ИСЭ	Измеряемое вещество	Ферментная система	Определяемые вещества
pH	Органические кислоты, выделяющиеся в ферментативной реакции	Гидролазы, оксидоредуктазы	Специфические субстраты и ингибиторы ферментов
NH_3	Аммиак	Уреаза, аминооксидаза, оксидазы аминокислот, нитрат- и нитритредуктаза	Мочевина, аминокислоты и их сумма, нитраты, нитриты
K, холин	Холин	Холинэстераза	Ацетилхолин
CO_3	CO_2, органические кислоты, выделяющиеся в ферментативной реакции	Холинэстераза, уреаза, карбоангидраза, тирозиндекарбоксилаза	Мочевина, ацетилхолин, тирозин, субстраты гидролаз
CN	Цианид	β-Гликозидаза	Амигдалин
I	Иодид	Пероксидаза	Субстраты пероксидаз

Сигнал амперометрических биосенсоров обычно связан с восстановлением молекулярного кислорода (субстрат оксидоредуктаз, показатель жизнедеятельности микроорганизмов); окислением пероксида водорода (субстрат пероксидазы, продукт реакций, катализируемых оксидоредуктазами); с окислением гетероциклов, входящих в состав

активных центров кофакторов ферментов, нуклеотидных оснований ДНК или медиаторов электронного переноса, добавляемых в раствор для повышения скорости процессов переноса электрона.

При постоянном потенциале и отсутствии торможения переноса электрона регистрируемый ток подчиняется уравнению Коттрелла (15), где D - коэффициент диффузии, t - время с начала регистрации сигнала.

$$i=\mathrm{nFSC}\sqrt{\frac{D}{\pi t}} \qquad (15)$$

Оно определяет характерную форму временной зависимости регистрируемого тока в хроноамперометрических методах измерения сигнала (регистрация тока при постоянном потенциале электрода).

Помимо данного режима, в вольтамперометрических биосенсорах часто используется линейное изменение потенциала во времени (постояннотоковая линейная и циклическая вольтамперометрия, изменение потенциала и тока, отвечающего идеально обратимому переносу электрона, представлены на рис.9).

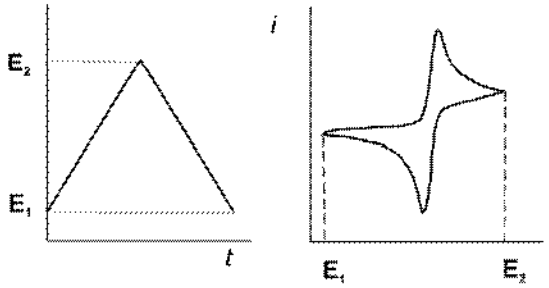


Рисунок 9. Изменение потенциала и регистрируемого тока в циклической вольтамперометрии (идеально обратимая реакция)

Ток пика i_p пропорционален концентрации окисляющегося (восстанавливающегося) вещества. Он зависит от скорости сканирования потенциала v. Если вещество диффундирует к электроду из раствора, $i_p \sim \mathrm{v}^{1/2}$, если вещество адсорбировано на электроде и стадия его диффузионного переноса отсутствует, $i_p \sim \mathrm{v}$.

В *импульсных методах* на электрод подают кратковременные (до 50 мс) импульсы напряжения различной формы и амплитуды, в конце каждого импульса производится измерение тока. Используют различные модуляции напряжения и регистрации сигнала, позволяющие повысить чувствительность измерения за счет снижения вклада нефарадеевских фоновых токов и улучшения разрешения близкорасположенных пиков.

Вольтамперометрические измерения проводят в трехэлектродной ячейке, включающей биосенсор, вспомогательный электроды и электрод сравнения (рис.10). В качестве преобразователя сигнала биосенсора

применяют платиновый, ртутный, серебряный металлические электроды, электроды на основе оксидов переходных металлов, углеродные материалы - графитовые пасты, стеклоуглерод, пирографит и др. Их могут дополнительно модифицировать до введения биологического компонента полимерными материалами, медиаторами электронного переноса, стабилизаторами и другими вспомогательными реагентами.

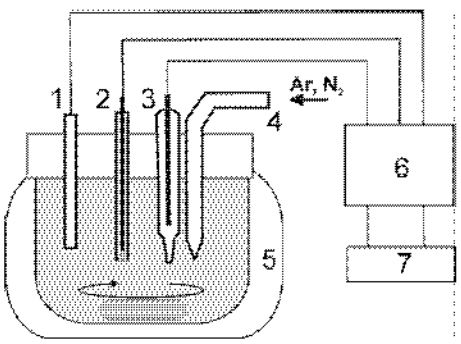


Рисунок 10. Принципиальная схема ячейки для проведения амперометрических измерений.
1 - вспомогательный электрод,
2 - биосенсор (рабочий электрод),
3 - электрод сравнения, 4 - система деаэрирования, 5 - система термостатирования,
6 - вольтамперограф, 7 - самописец или компьютер

▪ *Кондуктометрические сенсоры.* Электропроводность является обобщенной характеристикой раствора электролита, определяющейся его ионным составом. Она зависит от природы и концентрации ионов - носителей заряда, а также свойств раствора в целом - его диэлектрической проницаемости, температуры, ионной силы и др. Измерения электропроводности проводят с помощью мостиковых схем, различающихся по способу модуляции подающегося напряжения. Кондуктометрические сенсоры фиксируют изменение числа ионов и их природы. Поскольку ионы водорода и гидроксид-ионы обладают аномально высокой подвижностью, связанной с эстафетным механизмом их переноса в водном растворе, фактически кондуктометрические сенсоры измеряют изменение pH раствора в ходе ферментативной реакции. Таким образом, измерение электропроводности выступает как альтернатива потенциометрическому определению скорости этих процессов. В разбавленных растворах сигнал кондуктометрического сенсора более чувствителен к изменению концентрации носителя заряда, чем потенциал ион-селективного электрода.

Кондуктометрические ячейки схематически изображены на рис.11. В составе биосенсорных устройств применяют в основном золотые, платиновые или графитовые планарные электроды (б-г), изготавливаемые фотолитографически или методом струйного напыления на единой подложке.

Сходным образом функционируют импедиметрические сенсоры, в которых производится измерение амплитуды и частоты переменного тока

заряжения поверхностного слоя при наложении высокочастотного переменного напряжения. Анализ частотной составляющей сигнала позволяет рассчитать емкость и сопротивление поверхностного слоя электрода и прилегающего к нему раствора.

Такие сенсоры применяют для анализа процессов переноса заряженных частиц через тонкие поверхностные слои. Процессы биомолекулярного распознавания меняют характеристики электрохимического импеданса в результате изменения распределения заряда поверхностного слоя или его проницаемости для индикаторных ионов раствора. Это позволяет регистрировать присутствие антител в иммуносенсорах или белков и олигонуклеотидов в ДНК-сенсорах. Кроме того, импедимерические сенсоры используют при изучении процессов электрополимеризации (образования проводящих и непроводящих поверхностных слоев) и коррозии металлов.

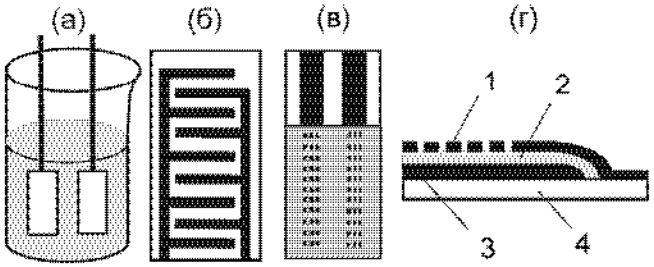


Рисунок 11. Кондуктометрические ячейки. а) с погружными электродами; б) с печатными гребенчатыми электродами; в) на основе пары планарных электродов, покрытых изолирующим слоем; г) кондуктометрический сенсор с послойным расположением электродов. 1 - сетчатый электрод, 2 - проводящий полимерный слой; 3 - нижний электрод; 4 - непроводящее основание

3.2. Другие преобразователи сигнала биосенсоров

Как отмечалось, электрохимические сенсоры используются в большинстве биосенсоров и биосенсорных устройств. Среди других способов регистрации сигнала представляют интерес пьезометрические, энтальпиеметрические и оптические сенсоры.

Пьезосенсоры представляют собой тонкую пластину, вырезанную из монокристалла α-кварца. При наложении на нее электрического поля возникает пьезоэффект - механические автоколебания пластинки с частотой порядка нескольких мегагерц, которые определяются свойствами кристалла и состоянием его поверхности. Для регистрации пьезоэффекта на

кристаллическую пластинку накладывают золотые или серебряные электроды возбуждения (рис.12). Кристалл кварца с электродами называют пьезокварцевым резонатором, или пьезорезонансным сенсором (пьезосенсором).

При увеличении массы поверхностного слоя частота колебаний кварца меняется в соответствии с уравнением Сорбри (16).

$$\Delta F=-2.3\times10^{6}F^{2}\frac{\Delta M}{S} \qquad (16)$$

В нем ΔF - изменение частоты осцилляций кристалла, Гц, F - резонансная частота пьезокристалла, МГц, ΔM - масса осажденной пленки, г, S - площадь электрода, см^2. Можно показать, что изменение частоты резонатора пропорционально массе покрытия (17). Поэтому данный сенсор получил название "кварцевых микровесов" (англ. - QCM, Quartz Crystal Microbalance).

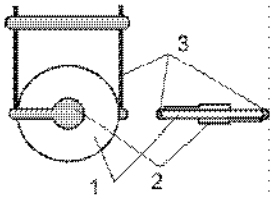


Рисунок 12. Пьезоэлектрический резонатор на основе кристалла кварца. 1 - пьезоэлемент, 2 - электроды возбуждения; 3 - элементы крепежа

$$\Delta F=-F\left(\frac{\Delta M}{M}\right) \qquad (17)$$

В составе биосенсоров пьезосенсоры применяют для прямого измерения прироста массы поверхностного слоя в результате аффинных взаимодействий - образования комплекса антиген-антитело или связывания комплементарных нуклеотидных последовательностей ДНК-зонда и однонитевой ДНК в анализируемом растворе. Чем больше масса определяемого компонента, тем выше чувствительность определения. Иммобилизацию компонентов проводят прямо на возбуждающих электродах, используя ковалентное связывание посредством сульфгидрильных групп на золоте, методы физической адсорбции, авидин-биотинового связывания и золь-гель технологии на других электродах.

Описано применение пьезосенсоров совместно с ферментами, способными вызывать деградацию полимеров (химотрипсин, цитохромы и липаза) или, наоборот, образование полимерных продуктов, осаждающихся на электродах возбуждения (пероксидаза в сочетании с хлорзамещенными нафтолами).

Энтальпиеметрические (калориметрические) сенсоры регистрируют количество теплоты, выделяющееся в ходе биохимических реакций. Основным параметром, регистрируемым в калориметрических устройствах,

является изменение температуры в ходе реакции, связанное с молярной энтальпией ΔH, количеством образующегося продукта n и теплоемкостью C_p (18).

$$\Delta T = -\frac{\Delta H n}{C_p} \qquad (18)$$

Измерение сдвига температуры ΔT в ходе биохимической реакции проводят с помощью термисторов. Это сопротивления, изготовленные из полупроводниковых керамик на основе оксидов марганца, никеля, кобальта, меди, железа и урана с большим отрицательным температурным коэффициентом электрического сопротивления. Для малых ΔT относительное изменение сопротивления термистора $\Delta R/R$ пропорционально ΔT (19).

$$\frac{\Delta R}{R} = -\left(\frac{B}{T^2}\right)\Delta T \qquad (19)$$

Коэффициент пропорциональности ($-B/T^2$) обычно равен -4% $^{\circ}C^{-1}$. Современные усилители позволяют достичь чувствительности измерения температуры порядка 100 мВ/0.001 К.

Существует достаточно много конструкций энтальпиеметрических сенсоров, отличающихся по способу осуществления биохимических реакций и по расположению термисторов. В качестве примера на рис.13 представлены два таких ферментных энтальпиеметрических сенсора - с ферментным реактором (а) и тонкопленочная ячейка с измерением сигнала в растворе фермента (б).

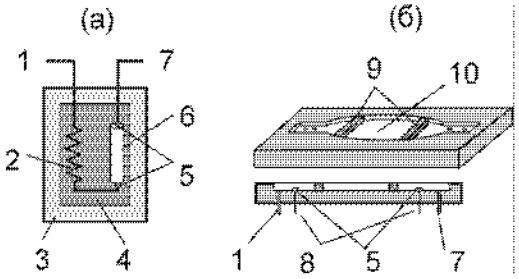


Рисунок 13. Проточная (а) и тонкопленочная (б) энтальпиеметрические ячейки. (1) - вход потока носителя, (2) - теплообменник, (3) - внешняя термоизоляция, (4) алюминиевый бокс, (5) входной и выходной термисторы, (6) ферментный или микробный реактор, (7) выход потока носителя, (8) электрические контакты с термисторами, (9) фильтры, (10) ячейка с анализируемым раствором

В первом случае проточная ячейка включает контрольный (входной) и выходной термисторы, теплообменник и термоизолирующий бокс, минимизирующий излучение тепла из ячейки. Во втором случае миниатюрная планарная ячейка изготавливается на кремниевой пластине и имеет размеры от нескольких миллиметров до десятых миллиметра. Благодаря этому, в частности, можно пренебречь внешним термостатированием.

Чувствительность энтальпиеметрических сенсоров в отношении ферментативных реакций невелика. Они обеспечивают возможность регистрации от 0.1 мМ до 10 мМ субстрата. Исключение составляют реакции каталазы. Значительно выше тепловые эффекты полиферментных реакций и особенно живых клеток. По этой причине энтальпиеметрические сенсоры активно применяют в составе микробных биосенсорных устройств.

- *Оптические сенсоры* основаны на регистрации изменений оптических характеристик биохимического компонента биосенсора или раствора, в котором происходит измерение сигнала. В большинстве своем они являются производными соответствующих методов исследования белков, нуклеиновых кислот и биологических мембран, принятых в молекулярной биологии и биохимии. На сегодняшний день для изучения биохимических процессов используют различные оптические методы:
  - ***нефелометрические*** - определение мутности раствора, прежде всего, в суспензиях микроорганизмов при контроле их численности, а также в осадительных вариантах методом иммуноанализа и ДНК-диагностики, когда в результате аффинных взаимодействий образуется продукт, малорастворимый в воде;
  - ***спектрофотометрические*** - по образованию окрашенных продуктов ферментативных реакций, поглощающих свет в видимой области и ближнем ультрафиолете. Применяется при контроле активности пероксидазы и определении субстратов и ингибиторов пероксидазы, щелочной фосфатазы и некоторых других ферментов;
  - ***флуорометрические*** - по спектрам флуоресценции нуклеиновых оснований ДНК или специальных меток - флуорогенов, включаемых в состав иммунореагентов в различных вариантах иммуноанализа.

Несмотря на мощные возможности, заложенные в оптических методах, они недостаточно реализованы на уровне сенсора, предполагающего, что измерительная часть и биохимический компонент должны находиться в непосредственном контакте, а измерение быть совмещено по времени с биохимической реакцией. Поэтому мы приведем только некоторые примеры реализации биосенсоров на основе оптических систем контроля.

- ***Люминесцентные сенсоры*** представляют собой фотоприемники малых потоков (вакуумные фотоэлектронные умножители, полупроводниковые фотодиоды), регистрирующие слабое вынужденное излучение, сопровождающее некоторые процессы биохимического окисления органических субстратов (явление биолюминесценции). Чаще всего для этого используют фермент люциферазу из некоторых микроорганизмов и светляков, гомогенаты светящихся бактерий или их живые культуры в виде суспензий или биопленок. Бактериальная люцифераза катализирует окисление алифатического альдегида C_{14} до миристиновой кислоты. Измерение биолюминесценции используют для определения растворенного кислорода, АТФ, диагностики бактериального загрязнения, а также антимикробных веществ, включая загрязнители окружающей среды и лекарства.
- ***Оптоды на основе оптического волокна*** представляют собой стеклянные нити из двух сортов стекла, подобранных таким образом, чтобы за счет полного внутреннего отражения происходил перенос светового потока вдоль оси волокна. Если на торец такой нити нанести вещество, способное к флуоресценции, можно проводить измерение факторов, влияющих на этот процесс. На основе этого принципа были созданы оптоды на ионы водорода и молекулярный кислород, нашедшие применение в составе ферментных сенсоров. Кроме того, созданы оптические сенсоры, в которых регистрация сигнала связана с нарушением полного внутреннего отражения при биохимических реакциях с участием компонентов, иммобилизованных на боковой поверхности оптического волокна.
- ***Сенсоры на основе явления поверхностного плазмонного резонанса*** (англ. SPR - Surface Plasmon Resonance) также используют явление полного отражения света на границе двух прозрачных сред - тонкого слоя золота и стекла. Для этого на поверхность золота под определенным углом подается пучок света лазера в ИК-диапазоне (рис.14). Меняя угол падения светового потока, можно подобрать условия, при которых происходит полное внутреннее отражение света, регистрируемое фотоприемником. На поверхности золота при облучении происходит образование т.н. плазмонов - квантовых колебаний электронного газа, взаимодействие которых с падающим светом приводит к поглощению части энергии излучения, происходящем в тонком приповерхностном слое. В окружающей среде генерируется затухающая волна, характеризующая резонанс плазмонов и лазерного излучения.

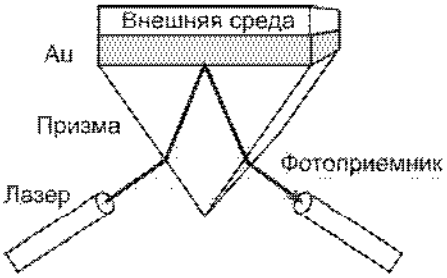


Рисунок 14 Установка для измерения поверхностного плазмонного резонанса. Сенсор позволяет регистрировать состояние поверхности на границе раздела золото - внешняя среда

Положение максимума поглощения определяется на сенсограммах - диаграммах зависимости энергии отраженного света от угла падения светового потока. Даже незначительные изменения отражательных характеристик золота приводят к смещению положения минимума на сенсограмме. Это используется для высокочувствительного детектирования разнообразных аффинных взаимодействий. Метод был специально разработан для исследования биоаффинных взаимодействий и сейчас активно используется для исследования кинетики и термодинамики взаимодействия биополимеров - иммунных реакций, комплексов ДНК с белками и т.д. Выпускаются промышленные биосенсорные системы, реализующие явление поверхностного плазмонного резонанса - BiaCore (“Pharmacia”) и IASys (“Affinity Sensors”).

Вопросы для самопроверки и углубленного изучения к главе 3

1. Каковы основные типы преобразователей сигнала в составе биосенсоров? Дайте характеристику электрода и оптода как преобразователей сигнала биосенсора.
2. Каковы принципы потенциометрической регистрации сигнала биосенсора? Каково устройство ионоселективного электрода и ион-селективного полевого транзистора ?
3. Дайте характеристику кондуктометрических биосенсоров. В каких случаях их применяют и каково устройство кондуктометрической ячейки?
4. Каким образом функционируют импедиметрические сенсоры и для чего нужно изучение электрохимического импеданса ?
5. Что представляют собой пьезосенсоры ? Какие биохимические компоненты используют совместно с пьезосенсорами в составе биосенсора?
6. Каков механизм формирования сигнала энтальпиеметрических сенсоров ? каковы принципы конструирования энтальпиеметрической ячейки?
7. Какие оптические методы используют при создании биосенсоров?

Глава 4. Ферментные сенсоры

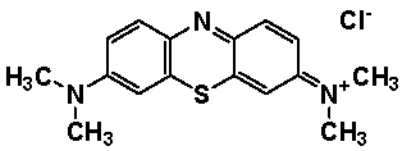
Выбор фермента для включения в состав биосенсора определяется, прежде всего, путями биохимических превращений определяемого соединения. В каждом конкретном случае принимается во внимание доступность фермента (наличие коммерческих препаратов, простота выделения и очистки), его стабильность при хранении и иммобилизации, наличие удобных для аппаратурного оформления способов регистрации сигнала, достигаемые аналитические характеристики определения субстрата/эффектора.

- Скорость ферментативной реакции определяют по изменению концентрации исходных веществ (субстратов) или продуктов их превращения. Первый вариант представлен практически только сенсорами на основе оксидоредуктаз, для которых таким субстратом является ***кислород***. Это связано с удобством его амперометрического определения с помощью т.н. электрода Кларка - платинового электрода, покрытого мембраной из гидрофобного материала. Кислород диффундирует сквозь покровную мембрану к электроду, где восстанавливается с переносом четырех электронов (20).

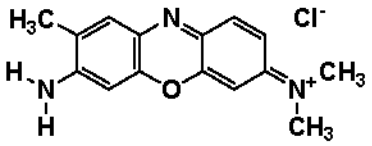
$$O_2 + 2\,H_2O + 4e^- \rightarrow 4\,OH^- \qquad (20)$$

Имеются приборы - оксиметры, в которых шкала отградуирована непосредственно в единицах концентрации или парциального давления растворенного кислорода. Если на поверхность такого электрода нанести иммобилизованный фермент, можно проводить измерение его активности по кривой спада концентрации кислорода, затрачивающегося на окисление органического субстрата.

- Вторым универсальным способом измерения ферментативной активности является ***определение пероксида водорода*** - продукта реакции многих оксидоредуктаз. Его можно измерять амперометрически по току окисления или восстановления, в том числе с использованием растворимых или иммобилизованных медиаторов, таких как металлоцианаты, (берлинская лазурь) или фенотиазиновые красители (рис.15).



Метиленовый синий



Толуидиновый синий

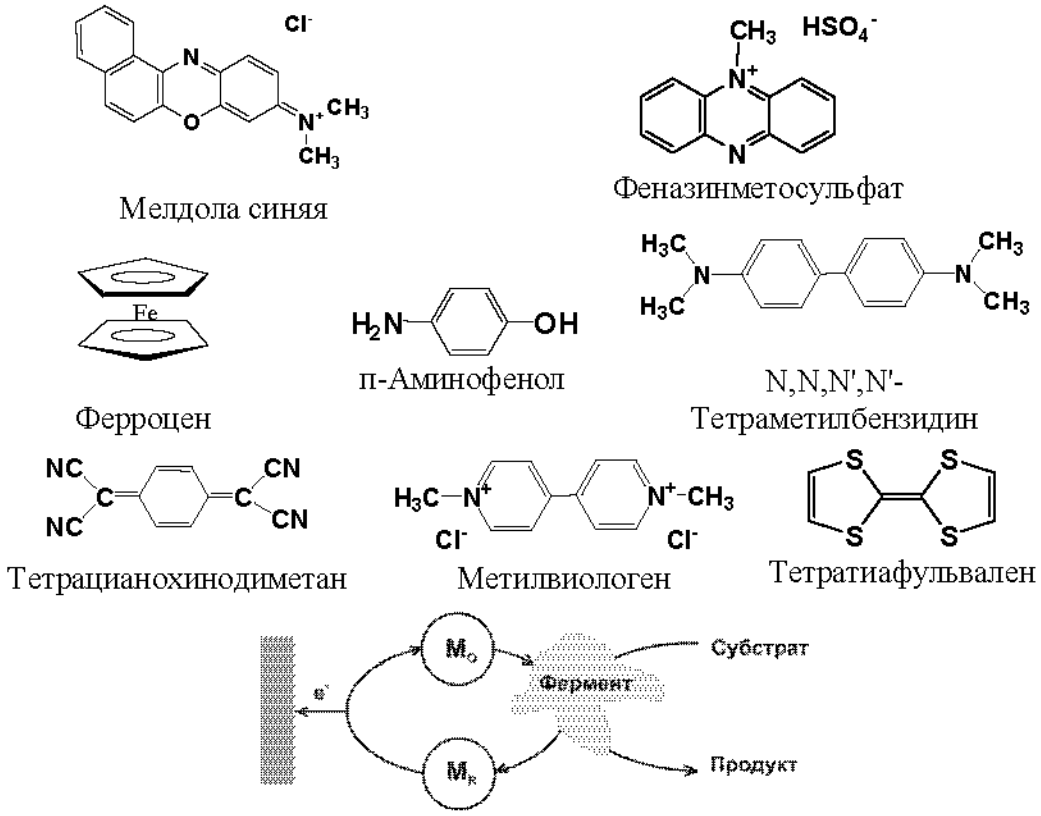
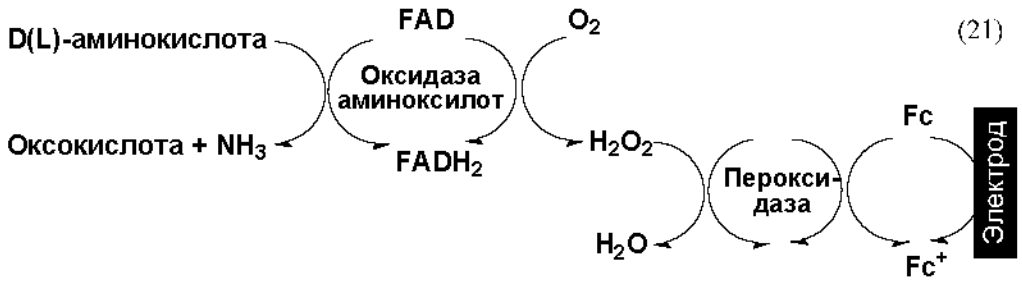


Рисунок 15. Медиаторы электронного переноса, используемые при создании ферментных сенсоров, и схема функционирования медиаторного ферментного сенсора. M_O и M_R - окисленная и восстановленная формы медиатора, соответственно

Применение медиаторов электронного переноса не только снижает перенапряжение восстановления пероксида водорода, но и позволяет избежать побочных реакций олигомеризации органических компонентов раствора, пассивирующих электрод. Пероксид водорода может также участвовать как субстрат в реакциях окисления органических соединений, катализируемых пероксидазой. Это позволяет использовать биферментные системы для определения органических соединений, непосредственно на электроде не реагирующих.

В качестве примера на схеме (21) показан способ определения аминокислот. Для этого используют реакцию их окисления в присутствии оксидазы аминокислот, кофактором которой является флавинадениндинуклеотид ($FADH_2$).



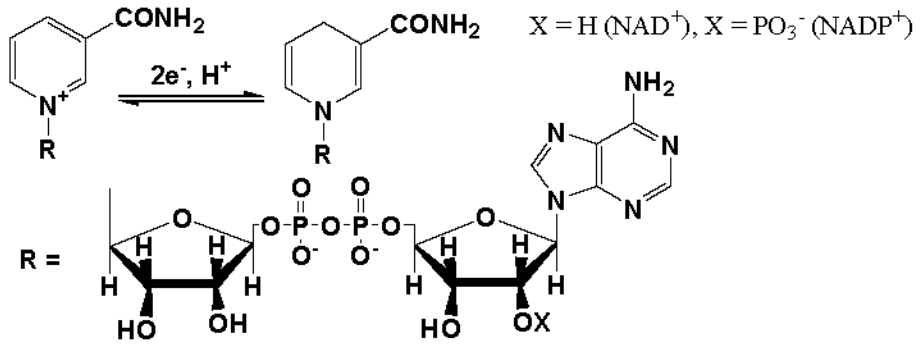
(21)

Регенерация рабочей формы кофактора происходит путем переноса электрона на молекулу кислорода, а образующийся пероксид восстанавливается в реакции с участием пероксидазы. Электрон переносится на электрод с помощью гетерогенного медиатора, поливинилферроцена (Fc).

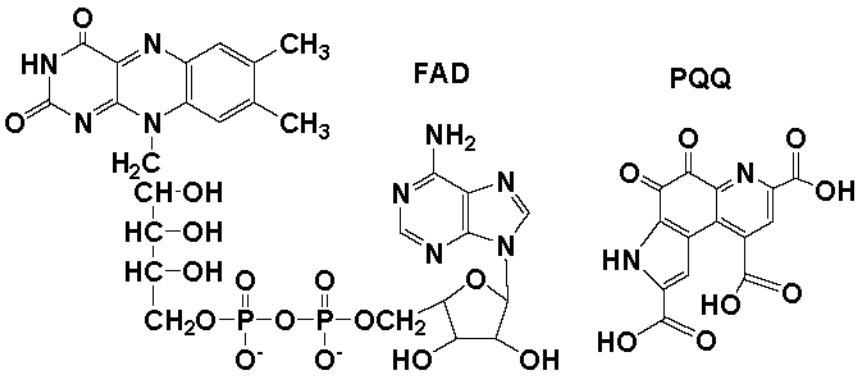
Пероксидазу можно определять также в фотометрических сенсорах с помощью хромогенных субстратов, образующих при окислении окрашенные продукты. Это производные бензидина с метоксильными и метильными заместителями, а также 4-аминоантипирин. Использование люминола в сочетании с йодбензолом дает высокочувствительный хемилюминесцентный способ определения пероксида водорода.

Третьим по значимости способом регистрации сигнала ферментного сенсора является ***определение различных форм кофакторов*** оксидоредуктаз. Это никотинамиддинуклеотид (NADH), его фосфат (NADPH), флавинадениндинуклеотид ($FADH_2$) и пирролохинолинхинон (PQQ) (22), а также некоторые железосодержащие редокс-центры ферментов.

Так, известно более 250 NAD-зависимых оксидоредуктаз, реакции которых можно регистрировать по окислительно-восстановительным превращениям этого кофактора. Определение указанных кофакторов возможно с использованием спектрофотометрических и флуоресцентных методов, но они не вполне подходят к сенсорным технологиям.



(22)



Поэтому основное внимание уделяется электрохимическим методам. Прямое окисление / восстановление кофакторов осложняется их участием в побочных химических и электрохимических стадиях, снижающих обратимость процесса и отравляющих электрод. Поэтому используют медиаторы электронного переноса (см. рис.15). Медиаторы могут добавлять в раствор (гомогенные медиаторы), присоединять к электроду отдельно или совместно с оксидоредуктазой (гетерогенные медиаторы) или включать в состав белка с последующим присоединением коньюгата к электроду. Некоторые варианты получения ковалентно связанных медиаторов представлены на рис.16.

- В некоторых случаях удается также зафиксировать ***прямой (безмедиаторный) электронный перенос*** на активный центр фермента. Обычно он находится глубоко в белковой глобуле, препятствующей его физическому контакту с электродом. Тем не менее, в случае ферментов лакказы и пероксидазы удалось получить сигнал биокаталитического восстановления пероксида водорода и молекулярного кислорода (23).

$$H_2O_2 + 2H^+ + 4e^- \xrightarrow{Пероксидаза} 2\,H_2O$$
$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \xrightarrow{Лакказа} 2\,H_2O \qquad (23)$$

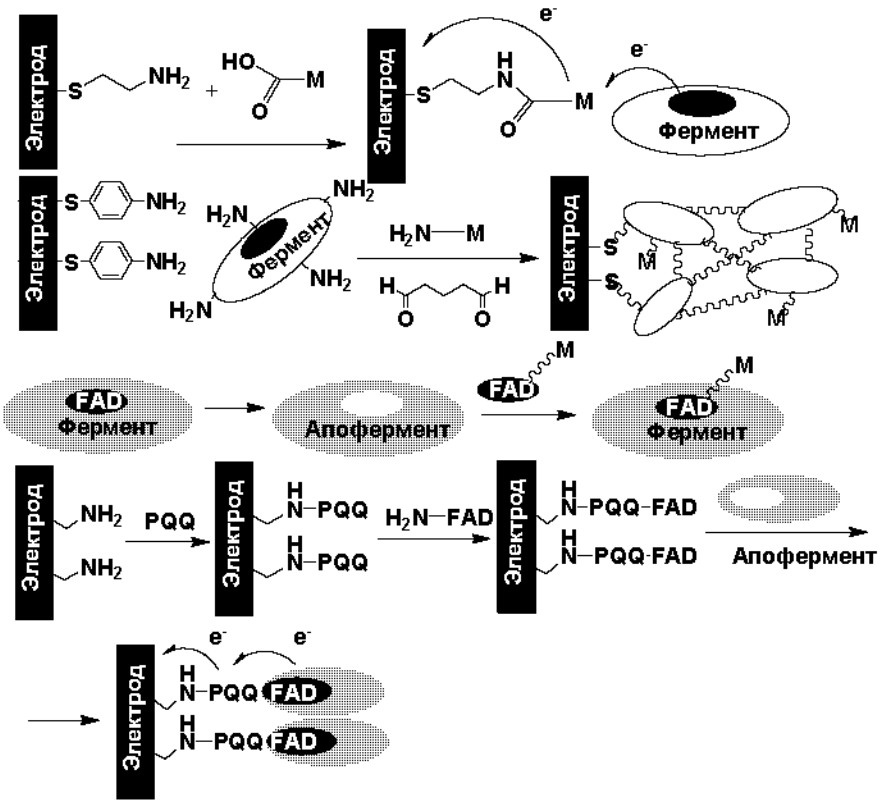


Рисунок 16. Способы включения медиаторов электронного переноса (M) в состав биосенсоров: модификация поверхности электрода, кросс-сшивка глутаровым альдегидом, модификация кофактора фермента, использование реконструированных ферментных систем

Для ***количественного выражения*** сигнала ферментного сенсора обычно принимают ряд допущений: распределение фермента в пределах ферментсодержащего слоя принимается равномерным, отсутствуют иные лимитирующие факторы транспорта низкомолекулярных компонентов реакции, в том числе влияние локальных изменений pH в результате выделения кислых продуктов окисления, что типично для оксидоредуктаз. В неравновесных условиях величина тока определяется по второму закону Фика (24).

$$\frac{d\left[C(x,t)\right]}{dt} = D\frac{\partial^2\left[C(x,t)\right]}{\partial x^2} \qquad (24)$$

В левую часть уравнения Фика подставляют уравнение скорости ферментативной реакции Михаэлиса-Ментен (25). В нем E, S, E-S и P

обозначают соответственно фермент, субстрат, фермент-субстратный комплекс и продукты ферментативной реакции, k_i - константы скорости соответствующих стадий ферментативного процесса, $[E]_0$ - исходная концентрация фермента ($[E]_0=[E]+[E\text{-}S]$), C - концентрация продукта, окисляющегося или восстанавливающегося на электроде, и K_M - константа Михаэлиса.

$$E+S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} E\text{-}S \xrightarrow{k_2} E+P$$

$$\frac{dC}{dt}=\frac{k_2[E]_0[S]}{K_M+[S]} \tag{25}$$

Решение ур.(25) дает стационарный сигнал ферментного сенсора I_k при условии $[S]>>K_M$ (лимитирующая стадия - ферментативное превращение субстрата).

$$I_k=\frac{I_{max}[S]}{K_M+[S]} \tag{26}$$

Здесь I_{max} - максимальное значение сигнала сенсора (27), L - толщина ферментсодержащего слоя, A - площадь электрода.

$$I_{max}=\frac{nFALk_2[E]_0}{2} \tag{27}$$

Если определяющим фактором является диффузионный перенос субстрата к ферментному сенсору, сигнал I_d линейно зависит от концентрации субстрата (28).

$$I_d=\frac{2I_{max}D[S]}{k_2[E]_0L^2} \tag{28}$$

4.1. Ферментные сенсоры в эколого-аналитическом контроле

В эколого-аналитическом контроле ферментные сенсоры используют для определения токсических соединений - загрязнителей окружающей среды антропогенного происхождения, а также для обобщенной оценки уровня загрязнения. Выбор фермента для включения в состав биосенсора определяется, исходя из того, какие ключевые (таргетные) ферментные системы подвергаются атаке токсиканта при его поступлении в живой организм. Специфичность ферментативного определения ингибиторов, как правило, ниже, чем субстратов, поэтому их содержание может выражаться условной концентрацией эталонного ингибитора, оказывающего то же действие, что и вся сумма компонентов анализируемой пробы. Например, при определении фосфорорганических и карбаминатных пестицидов по их

ингибирующему действию на фермент холинэстеразу в качестве эталонного токсиканта выступает параоксон или дихлорфос.

- ***Определение ингибиторов***. Механизм действия ингибиторов на ферменты разнообразен. Помимо специфических взаимодействий с определенными рецепторными участками или отдельными функциональными группами белка, снижение сигнала ферментного сенсора может быть связано с отклонением условий проведения реакции от оптимальных (изменение pH в ходе реакции, нагрев раствора и т.д.). Это может служить источников ошибок при измерении. Ферментные сенсоры позволяют обнаруживать $n\times(10^{-5}\text{-}10^{-9})$ М токсикантов, что иногда достаточно для проведения определения без предварительного концентрирования пробы.

Механизм взаимодействия фермента и ингибитора определяет выбор концентрации субстрата и способа измерения сигнала. Если образующийся фермент-ингибиторный комплекс достаточно прочен (необратимое ингибирование), реакцию обычно проводят в два этапа - сначала добавляя к ферментному сенсору ингибитор (стадия инкубирования) и только затем субстрат (стадия измерения сигнала). В случае обратимого ингибирования измерение сигнала проводят в одну стадию. В обоих случаях мерой содержания токсиканта является относительное уменьшение сигнала биосенсора. Как правило, снижение концентрации субстрата увеличивает чувствительность определения ингибитора, но не всегда.

Особое значение имеют ферментные сенсоры на основе холинэстеразы. Данный фермент катализирует гидролитическое расщепление ацетилхолина, нейротрансмиттера, присутствующего у всех высших животных (29).

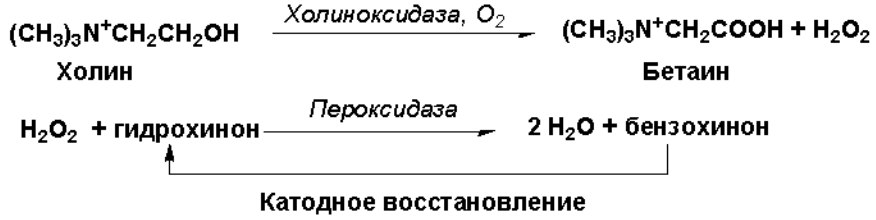
$$\underset{\text{Ацетилхолин}}{(CH_3)_3N^+CH_2CH_2OC(O)CH_3} \xrightarrow{\textit{Холинэстераза}} \underset{\text{Холин}}{(CH_3)_3N^+CH_2COOH} + CH_3COOH \qquad (29)$$

Ингибиторы холинэстераз снижают активность этого фермента, что может приводить к судорогам, нарушениям мышечной активности, при тяжелых отравлениях - к летальному исходу. В конце 20 века в год фиксировали до 200 000 отравлений фосфорорганическими пестицидами, в основном в странах третьего мира. Фосфорорганические пестициды образуют прочный комплекс с ферментом - фосфорилированную холинэстеразу, которая гидролитически устойчива и теряет способность взаимодействовать с ацетилхолином. Ионы тяжелых металлов образуют обратимые фермент-ингибиторные комплексы, поэтому их действие на фермент, как правило, не приводит к патологическим изменениям на уровне организма в целом.

Активность холинэстеразы и содержание ингибитора можно измерять различными способами. В *потенциометрических* сенсорах измеряется выделение в реакции уксусной кислоты (29). Для этого используют как стандартные pH-метрические электроды, так и полевые транзисторы. Фермент иммобилизуют на поверхности активной части сенсора, измерение проводят в слабобуферных средах в слабощелочной среде, отвечающей максимуму активности холинэстеразы. Также разработан сенсор на основе холин-селективного электрода и калий-селективного электрода, потенциал которого также чувствителен к холину.

Амперометрическое определение активности холинэстеразы и ее ингибиторов проводят двумя способами.

- С помощью синтетических субстратов - эфиров тиохолина, индоксилацетата или аналогичных. Продукты их ферментативного гидролиза окисляются с образованием различных продуктов - дисульфидов в случае тиохолинов и индиго в случае индоксилацетата.
- С помощью биферментной системы холинэстераза - холиноксидаза. Второй фермент катализирует окисление холина до бетаина. Оба фермента иммобилизуют совместно на поверхности электрода, холиноксидазу могут также добавлять в раствор, поскольку ее удельная активность ниже, чем активность холинэстеразы. Сигналом сенсора служит ток восстановления пероксида водорода, в том числе, в присутствии медиаторов электронного переноса или третьего фермента - пероксидазы (30).



(30)

Фотометрическое определение ингибиторов холинэстеразы проводят с помощью хромогенных субстратов - эфиров индофенола, индоксилацетата (подходит также для флуорометрического определения), цветных pH-индикаторов (бромтимоловый синий, нейтральный красный).

Большинство приведенных способов регистрации сигнала холинэстеразных сенсоров также подходит для определения ингибиторов неспецифических карбоксилэстераз. Данная группа ферментов катализирует гидролиз незаряженных эфиров карбоновых кислот и также ингибируется фосфорорганическими и карбаминатными пестицидами.

Имеются коммерческие биосенсоры и биосенсорные устройства для определения остаточных количеств фосфорорганических и карбаминатных пестицидов в воде, почве, растительной продукции и атмосферном воздухе. Индикаторные наборы и бумаги выпускают такие известные фирмы, как "Boeringher Mainheim" (Германия) и "Ohmicron" (США). В 1972 г. американской кампанией "Midwest Research Institute" был налажен выпуск автоматизированных анализаторов CAM-1,2 на основе амперометрической регистрации сигнала. Потенциометрический холинэстеразный сенсор использовали для контроля качества вод реки Сены в пригороде Парижа в составе автоматизированного гидрохимического поста.

Другие примеры использования ферментов для определения загрязнителей окружающей среды - приведены в табл.2.

Таблица 2. Ферментативные методы определения ингибиторов - загрязнителей окружающей среды

Фермент	Определяемые вещества
Цитохром *c* оксидаза	Цианиды, сероводород, атразин
Тирозиназа	Фосфорорганические, тио- и дитиокарбаминатные пестициды, хлорфенолы, тиомочевина, гидразин и его метилпроизводные
Пероксидаза	Цианиды, фториды, сульфиды, тиомочевина и ее производные, метилизоцианат, фенолы, ртуть(II) и ртутьорганические соединения, Cd(II), Bi(III)
Алкогольдегидрогеназа	Цианиды, ртуть (II)
Алкогольоксидаза	Ртуть (II)
Кислая фосфатаза	Фториды, фосфорорганические пестициды, альдикарб
Щелочная фосфатаза	Фосфорорганические и карбаминатные пестициды, Pb(II)
Уреаза	Ионы тяжелых металлов
Холинэстераза	Фосфорорганические и карбаминатные пестициды, ионы тяжелых металлов, СПАВ, фториды
Карбоксилэстераза	Фосфорорганические и карбаминатные пестициды, не имеющие в составе заряженных групп

❑ ***Определение субстратов*** - загрязнителей окружающей среды имеет главным преимуществом по сравнению с ингибиторными биосенсорами то, что после измерения отсутствует необходимость в регенерации фермента, связанного с ингибитором. Само измерение проводится в один этап (добавление анализируемого раствора, содержащего субстрат). В то же время, чувствительность сигнала ферментных сенсоров в отношении субстратов значительно ниже, чем в отношении ингибиторов. В большинстве случаев речь идет об определении микромолярных концентраций субстратов.

Применительно к загрязнителям окружающей среды это означает, что перед измерением необходимо провести предварительное концентрирование пробы. В табл.3 приведены данные об использовании ферментных систем для определения специфических субстратов ферментов.

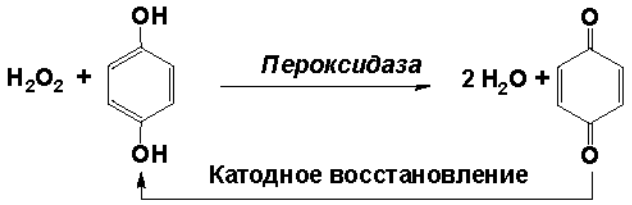
Таблица 3. Ферменты для определения субстратов - загрязнителей окружающей среды

Фермент	Субстрат	Фермент	Субстрат
Сульфитоксидаза	SO_2, сульфиты	Цитохром *c*	SO_2, сульфиты
Лакказа	Фенолы, амины	Цитохром P_{450}	Амины, спирты
Пероксидаза	Фенолы, амины	Фосфатриэстераза	Пестициды
Тирозиназа	Фенолы, амины	Аминооксидаза	Амины
Уреаза	Мочевина	Роданеза	Сероводород

Наиболее перспективны сенсоры на основе пероксидазы и тирозиназы, способные катализировать реакции окисления широкого круга субстратов, прежде всего, фенолов и аминов. Сенсоры на основе пероксидаз используют для определения сверхмалых количеств пероксида водорода, индикатора загрязнения атмосферного воздуха и некоторых стрессовых факторов. Определение фенолов с помощью указанных соединений проводится по количеству пероксида водорода, расходуемого или выделяемого в зависимости от природы фермента. В случае пероксидазы субстрат также определяют по количеству выделяющегося продукта окисления.

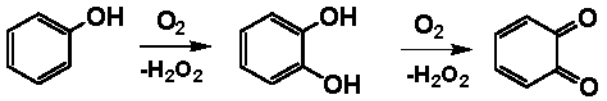
Его катодное восстановление в ряде случаев приводит к регенерации в пределах поверхностного слоя исходного соединения. Это повышает чувствительность определения таких соединений по сравнению с другими биосенсорами - оптическим или флуоресцентным. В качестве примера схема

(31) представляет такое циклическое превращение субстрата на примере гидрохинона.



(31)

Тирозиназа (полифенолоксидаза) катализирует реакцию окисления фенола и некоторых других ароматических, легко окисляющихся кислородом воздуха, соединений. Реакция протекает в несколько стадий, включая внедрение второй гидроксильной группы и последующее окисление субстрата до хинона. Внедрение гидроксогруппы происходит преимущественно по орто- и пара-положению. Как и в случае пероксидазы, мерой скорости пероксидазной реакции является изменение концентрации пероксида водорода или количество восстанавливающегося на катоде продукта.



(32)

Как и в случае холинэстеразного определения пестицидов, селективность пероксидазного определения ароматических спиртов и аминов можно повысить с помощью батареи биосенсоров, включающих пероксидазы и тирозиназы различного происхождения.

Пероксидазные и тирозиназные сенсоры рассматриваются как альтернатива некоторым традиционным способам обобщенной оценки загрязнения коммунальных и некоторых производственных сточных вод легко окисляющимися органическими соединениями. Биосенсоры позволяют получать результат в течение 20-60 мин. в полуавтоматическом режиме и хорошо сочетаются с имеющимися средствами измерения (оксиметры, респирографы), чем выгодно отличаются от традиционных средств "мокрой химии", продолжительных (до 20 суток в случае БПК) и требующих квалифицированного исполнения.

Фосфатриэстераза, или гидролаза органических эфиров фосфорной кислоты, - фермент, катализирующий реакции гидролитического расщепления фосфорорганических пестицидов и боевых отравляющих веществ нервно-паралитического действия. В отличие от холинэстеразы, сенсоры на основе фосфатриэстераз позволяют проводить определение в одну стадию, сигналом служит смещение pH в результате выделения фосфорной кислоты (ее неполных эфиров). Разработаны

автоматизированные системы контроля присутствия соответствующих соединений в воде и воздухе, в том числе, в рамках борьбы с терроризмом.

Перспективным компонентом для использования в составе субстратных сенсоров, является цитохром P_{450}. Этот полиферментный комплекс, локализованный в эндоплазматическом ретикулуме клеток печени, является важной составляющей механизма детоксикации чужеродных соединений. Наряду с цитохромами P_{448} и системами их регенерации - NADPH-редуктазами, данные ферменты осуществляют функции C-гидроксилирования и N-метилирования целой группы субстратов, включающих липиды, многие фармакологические препараты, а также небольшие молекулы ксенобиотиков - производных анилина, фенола и полиаминов. Механизм окисления весьма сложен и в зависимости от природы субстрата может иметь различные ответвления.

Сложность регенерации активной формы цитохрома P_{450}, требующей присутствия малоустойчивого и дорогостоящего NADPH и соответствующего фермента, NADPH-редуктазы, затрудняет его прямое включение в состав биосенсора. Тем не менее, разработаны варианты оптических биосенсоров, регистрирующих непосредственно окислительно-восстановительный переход железосодержащего кофактора, а также электрохимические биосенсоры для определения анилина, некоторых других окисляющихся соединений. Чтобы обойти проблему регенерации NADPH, предложены различные подходы: применение вместо NADPH-редуктазы более доступного и устойчивого фермента - глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы, а также прямое окисление NADPH на электроде, модифицированном специально подобранными медиаторами электронного переноса. Кроме того, предложено использовать вместо выделенного цитохрома P_{450} органеллы (митохондрии), содержащие все необходимые компоненты реакции.

4.2. Ферментные сенсоры в медицине

Как уже отмечалось выше, первым биосенсором был глюкозный электрод, в котором фермент глюкозооксидаза катализировала реакцию окисления глюкозы до глюконолактона. Фермент находился в водном растворе между двумя диализными мембранами, закрепленными на поверхности кислородного датчика (33).

(33)

Сейчас до 85% мирового рынка биосенсоров приходится на выпуск глюкозных сенсоров - глюкометров. Суммарный объем продаж в 2004 г. составил около 5 млрд. долларов США. В настоящее время 11 компаний выпускает 33 модели глюкометра, которые отличаются по способу выполнения биосенсорной части, требуемому объему крови, времени измерения, требованиям к месту пробоотбора и стоимости. По данным медицинской статистики число больных диабетом, нуждающихся в регулярных измерения глюкозы в крови, продолжает расти и составит, по оценкам ВОЗ, к 2025 году до 300 млн. человек. На долю развитых стран с наиболее платежеспособным населением приходится порядка 17% больных сахарным диабетом, что дает возможность рассчитывать на стабильный рынок соответствующих измерительных устройств. Важнейшим прорывом на рынке глюкометров стала разработка Крэнфилдского биотехнологического центра. В ней измерительная часть представляла собой сменный печатный графитовый электрод, на котором иммобилизовали глюкозооксидазу и ферроцен (34).

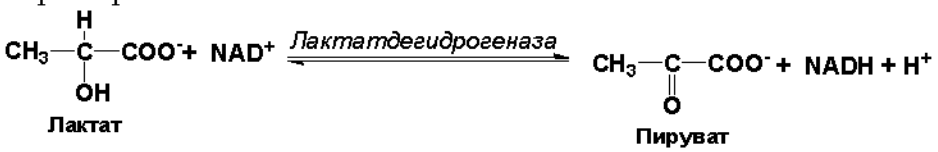
(34)

Глюкометр "ExacTec" выпускала компания "MediSense" (с 1996 г. - подразделение "Abbott"), в 1987 г. Весь прибор имел размеры ручки или микрокалькулятора. В настоящее время ежегодно продается более миллиарда сменных электродов для глюкометров "ExacTec".

Современные глюкометры основаны в основном на тех же принципах регистрации сигнала. Основные направления развития парка оборудования включают уменьшение объема требуемой крови, повышение точности и удобства использования глюкометра. Сейчас разработаны глюкометры, требующие для анализа не 50 мкл, как первый "ExacTec", а менее 1 мкл крови, причем в ряде случаев одновременно с глюкозой производится определение холестерола и молочной кислоты.

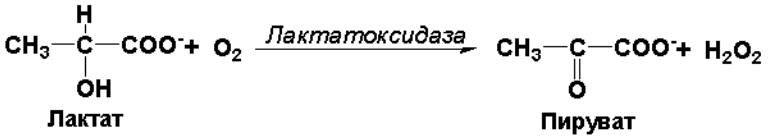
Среди специфических субстратов ферментов биомедицинского значения следует выделить молочную кислоту (лактат), а также продукт ее восстановления - пировиноградную кислоту (пируват). Данные два метаболита взаимно переходят друг в друга в зависимости от редокс-статуса биологической среды под действием лактатдегидрогеназы (35). Это NAD-зависимая оксидоредуктаза, активность которой и направление реакции

зависят от соотношения концентраций окисленной и восстановленной форм кофактора $NAD^+/NADH$.



(35)

Содержание лактата является маркером функционально анаэробного состояния мышц и одним из параметров оценки общего состояния больного в послеоперационный период, при обследовании больных в состоянии общего истощения, спортсменов после значительных физических нагрузок и т.д. Лактатные сенсоры используют электрохимические преобразователи сигнала на основе модифицированных электродов. В качестве модификаторов применяют медиаторы электронного переноса, эффективные в отношении NADH. Это феноксазины и фенотиазины, комплексы металлов - порфирины, цианины, цианиды, а также углеродные нанотрубки. Кроме того, для определения лактата используют лактатоксидазу, катализирующую окисление лактата до пирувата с одновременным восстановлением кислорода (36).



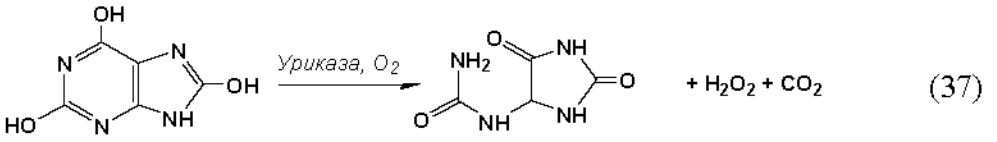
(36)

Рабочий потенциал лактатного сенсора можно снизить, вводя в реакцию пероксидазу, иногда в сочетании с медиаторами электронного переноса. Описано значительное число медиаторных биосенсоров на основе лактатоксидазы, включающих в качестве акцепторов электронов производные ферроцена, фенилендиамин, металлоцианаты и хиноны.

К числу основных метаболитов плазмы крови, помимо глюкозы, лактата и пирувата, относят мочевину, мочевую кислоту, креатинин, аминокислоты, аммиак, липиды, триацилглицерин и холестерин.

Креатинин, креатин, мочевая кислота и мочевина участвуют в метаболическом цикле азота, включая его выделение из организма после расщепления белков и аминокислот. Они являются индикаторами ряда дисфункций организма, связанных с выделением избыточного азота и развитием таких заболеваний, как подагра, мочекаменная болезнь, инфекционные заболевания выделительных и половых органов. Кроме того, некоторые азотсодержащие гетероциклы являются индикаторами качества мяса и рыбы.

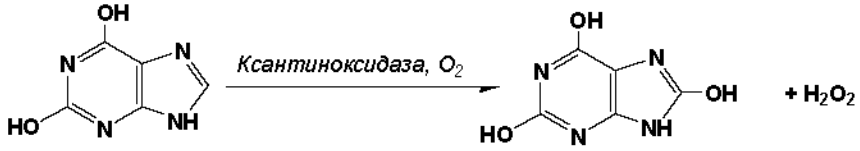
Биосенсор для определения *мочевой кислоты* содержит уриказу, катализирующую реакцию окисления с образованием аллантоина и пероксида водорода, по которому регистрируют сигнал биосенсора (37).



(37)

Мочевая кислота **Аллантоин**

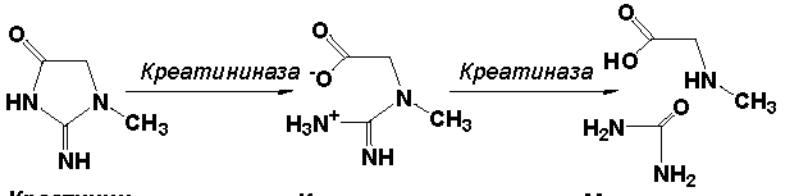
Предшественником мочевой кислоты является *гипоксантин*, определение которого проводят с помощью биферментного сенсора с ксантиноксидазой и уриказой (38).



(38)

Гипоксантин **Мочевая кислота**

Мочевину определяют потенциометрическим уреазным сенсором на основе аммиак-, реже карбонат-чувствительного сенсора, покрытого слоем иммобилизованного фермента (см.реакцию (13)). *Креатинин* - продукт гидролиза креатинфосфата, выделяющийся с мочой наряду с мочевиной,- определяют с помощью ферментов креатининазы, превращающей его в креатин, и креатиназы, дающей саркозин и мочевину (39). Последнюю можно определить с помощью потенциометрического уреазного сенсора.



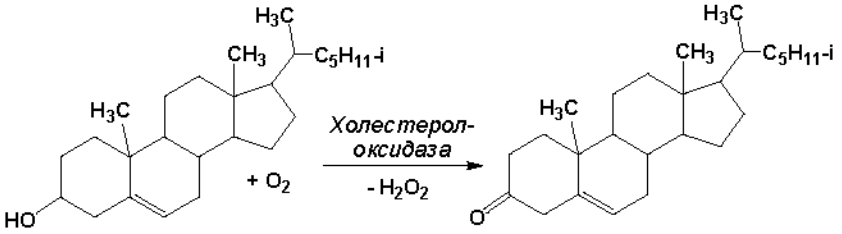
(39)

Креатинин **Креатин** **Мочевина**

Разработаны потенциометрические и амперометрические биосенсоры на креатинин, включающие следующие ферменты: креатининдеиминазу, креатинин амидогидролазу (одну или вместе с саркозиноксидазой), креатинин иминогидролазу. В амперометрических сенсорах сигналом служил ток восстановления кислорода и окисления пероксида водорода. Предложены также импедиметрические и флуоресцентные биосенсоры на основе креатининдеиминазы.

Холестерол, содержание которого определяют при диагностике атеросклероза, окисляют с помощью фермента холестеролоксидазы (40).

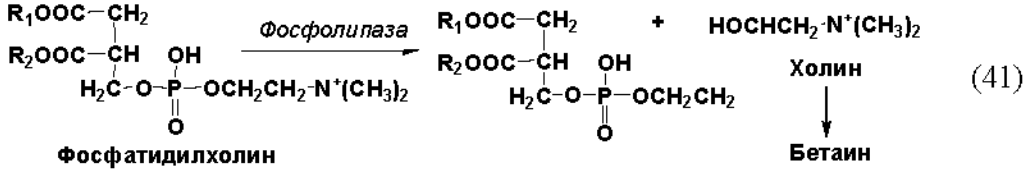
Для определения полного холестерола предварительно проводят гидролиз его эфиров с помощью холестеролэстеразы.



(40)

Фосфолипиды определяют с помощью ферментных сенсоров на основе фосфолипазы, катализирующей гидролиз с высвобождением холина, который далее вовлекается в реакцию холиноксидазы с образованием бетаина (41). Сигнал биосенсора регистрируется по количеству пероксида водорода, выделяющегося при образовании бетаина (см. реакцию 30).

Глицерин можно количественно определять с помощью ферментного сенсора на основе NAD-зависимой глицеролдегидрогеназы и оптода, регистрирующего присутствие NADH. Примерами биосенсоров на основе других принципов регистрации сигнала могут служить термисторы с иммобилизованной глицерокиназой, амперометрический и оптический полиферментные сенсоры. Последние включают в состав три фермента - глицерокиназу, катализирующую присоединение фосфатного остатка в присутствии ATF; глицерофосфатдегидрогеназу, окисляющую глицерофосфат, и пероксидазу для регистрации выделяющегося в последовательности реакций пероксид водорода.



(41)

Некоторые другие ферментативные реакции, применяемые для определения соединений, имеющих значение в клиническом анализе, и реализованные в виде биосенсоров и биосенсорных устройств, приведены в табл.4.

Таблица 4. Ферменты в составе биосенсоров биомедицинского назначения и определяемые с их помощью субстраты

Фермент	Субстрат	Фермент	Субстрат
Глутаматоксидаза	Глутамат	β-Галактозидаза	Лактоза

Оксалоацетат-карбоксилаза, пируватоксидаза	Оксалоацетат	Цитохром P_{450}	Амины, спирты, холестерин
Оксидаза L-аминокислот	L-аминокислоты, лекарственные препараты - производные пролина	Пероксидаза	Аскорбиновая кислота, витамин B_{12}, γ-аминобутановая кислота
β-Тиогликозидаза, глюкозооксидаза	Гликозинолаты	Моноамин-оксидаза	Первичные амины
Пенициллаза	Пенициллин	Пируватоксидаза	Пируват
Нуклеозид-фосфорилаза	Инозин	Глюкозодегидрогеназа	Катехоламин
Диаминооксидаза	Путресцин	Глутаминат-оксидаза	Глутамин

Большинство из них также применимо для решения задач контроля процессов переработки пищевого сырья, микробиологических процессов получения продуктов брожения, в фармации и родственных отраслях промышленности. Следует отметить, что реальный список ферментных сенсоров значительно больше, в таблице нашли отражение только ферментные сенсоры на основе коммерчески доступных ферментных препаратов, или апробированные на реальных объектах контроля.

Помимо индивидуальных соединений, ферментные сенсоры нашли применение в контроле обобщенных параметров, характеризующих состояние организма или окружающей среды. К ним, например, относится оценка содержания реакционноспособных соединений кислорода. Это супероксидный анион, пероксид водорода и некоторые гидроперекиси, образующиеся в радикальных реакциях, в том числе, в результате регуляторных процессов и действия стрессовых факторов.

Например, уровень пероксида водорода в растительных тканях является индикатором загрязнения окружающей среды диоксидом серы и компонентами фотохимического смога (озон, пероксиацетилнитрат, пероксид водорода). Его измеряют с помощью визуальных, фотометрических и электрохимических биосенсорных устройств на основе пероксидазы. Сумму реакционноспособных соединений кислорода определяют также косвенно по продуктам окислительной деградации

некоторых белков и гетероциклических оснований цикла мочевины (ксантин, креатин, гипоксантин).

Биосенсоры на основе ксантиноксидазы используют для оценки влияния природных и синтетических антиоксидантов, влияющих на выход супероксидного радикала в присутствии гипоксантина, контролируемого данным ферментом. Активность цитохрома P_{450} служит биохимическим маркером высокого уровня хлорароматических соединений в окружающей среде. Биосенсоры на основе пероксидазы и/или тирозиназы позволяют определять суммарное содержание в сточных водах фенолов и ароматических аминов.

Вопросы для самопроверки и углубленного изучения к главе 4

1. Как измеряют скорость реакции с участием иммобилизованного фермента?
2. Назовите преимущества медиаторных ферментных сенсоров. Как выбирают медиаторы для включения в состав биосенсоров?
3. Чем ограничены верхняя и нижняя границы определяемых содержаний субстрата при использовании ферментных биосенсоров?
4. Как количественно определить содержание ингибитора по сигналу ферментного сенсора?
5. Как выбрать условия определения ингибитора в зависимости от механизма ингибирования?
6. Приведите примеры использования ферментных сенсоров в эколого-аналитическом контроле.
7. Какие ферменты используются в составе биосенсоров, применяемых в биомедицинском анализе?
8. Как можно количественно характеризовать сигнал ферментных сенсоров с групповой селективностью в отношении субстратов (эффекторов)?

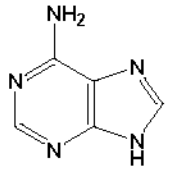
Глава 5. ДНК-сенсоры

Нуклеиновые кислоты способны образовывать самые различные связи с определяемыми соединениями. Благодаря многоточечному, или кооперативному, взаимодействию за счет водородных, электростатических и донорно-акцепторных связей и гидрофобных взаимодействий ДНК реагирует с биомолекулами высокоспецифично, что делает их перспективными элементами биосенсоров. Интерес к созданию ДНК-сенсоров связан с решением следующих актуальных биоаналитических и медицинских проблем:

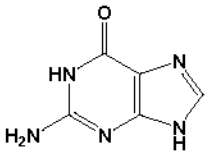
- идентификация биологического материала по первичной последовательности нуклеотидов (установление отцовства, расшифровка генома, диагностика патогенных микроорганизмов и вирусов);
- совершенствование методов ранней диагностики и лечения онкологических заболеваний (скрининг противоопухолевых препаратов, их ранняя диагностика по специфическим биохимическим маркерам);
- определение фармакологических препаратов противоракового действия и ДНК-повреждающих факторов, включая действие мутагенных факторов, ионизирующего излучения.

Существуют три подхода к регистрации взаимодействия ДНК - определяемое вещество.

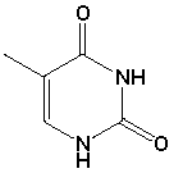
- Прямое определение факта комплексообразования по изменению массы ДНК, сорбированной на поверхности масс-чувствительного сенсора - пьезоэлемента. Этот способ особенно пригоден для регистрации процесса гибридизации - взаимодействия определенных последовательностей нуклеотидов, комплементарных друг другу. При их взаимодействии происходит образование устойчивых пар основных нуклеотидов ДНК - аденина и тимина, гуанина и цитозина (рис.17). В результате образуется сдвоенная спираль из двух участков, в которой каждый нуклеотид реагирует с каждым. Для определения низкомолекулярных соединений - ионов и лекарственных препаратов - метод практического значения не получил.
- Обнаружение специфических изменений самой ДНК (обратимые и необратимые конформационные изменения, частичный гидролиз, метилирование или частичное окисление отдельных нуклеотидов) по электрохимическим, оптическим или иным характеристикам самой нуклеотидной последовательности.



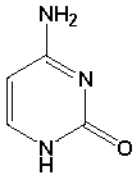
Аденин (А)



Гуанин (Г)



Тимин (Е)



Цитозин (Ц)

Рисунок 17. Двунитевая спираль ДНК и нуклеотиды, входящие в состав дезоксирибонуклеиновых кислот

- Включение в состав олигонуклеотидов меток, обнаруживаемых электрохимическими или оптическими детекторами. Это могут быть электрохимически активные группировки, ферменты, комплексы металлов, флуорогенные заместители, которые либо ковалентно связаны с олигонуклеотидными последовательностями (ДНК-зондами), либо находятся в растворе или поверхности носителя, где и реагируют с ДНК.

По характеру взаимодействий и решаемым задачам ДНК-сенсоры можно условно разделить на две группы.

- *ДНК-сенсоры для регистрации гибридизационных взаимодействий* предназначены для обнаружения определенных участков ДНК (обычно до 20 нуклеотидов), так называемых *мишеней* (рис.18).

Для этого в состав сенсора вводят *ДНК-зонды* - синтетические олигонуклеотиды, комплементарные последовательности нуклеотидов мишени. Помимо задач медицинской диагностики (установление природы патогенной микрофлоры), такие ДНК-сенсоры могут регистрировать точечные мутации нативной ДНК и генетический полиморфизм (природные вариации нуклеотидной последовательности ДНК в рамках отдельных генов, ответственных за синтез определенных белков), а также повреждающее действие генотоксических факторов различной природы.

- ***Аффинные ДНК-сенсоры*** используют для характеристики взаимодействий между ДНК и белками или низкомолекулярными соединениями - противораковыми препаратами, биомаркерами заболеваний и др. В качестве элемента распознавания в них могут использоваться одно- и двухцепочечные олигонуклеотиды, а также нативная или термически денатурированная ДНК. Аффинные взаимодействия с участием ДНК в составе биосенсора моделируют многие биохимические процессы, связанные с репликацией ДНК и трансляцией генетической информации в живых клетках.

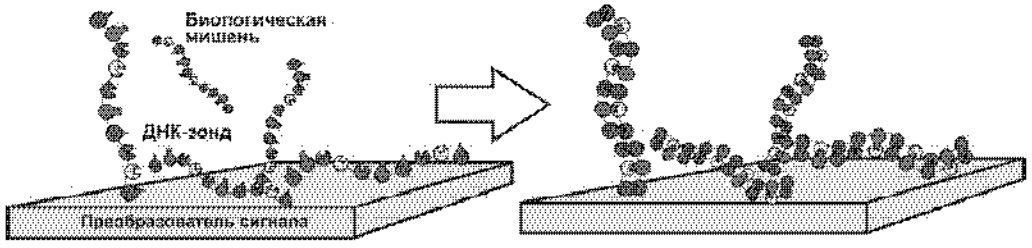


Рисунок 18. Схематическое изображение процесса гибридизации между ДНК-зондом на поверхности преобразователя сигнала и биологической мишенью - комплементарной зонду олигонуклеотидной последовательностью в растворе

Важным различием двух типов ДНК-сенсоров является их специфичность в отношении определяемого соединения. Сенсоры для контроля гибридизации способны давать почти абсолютно селективный отклик на комплементарную мишень и способны в ряде случаев отличать олигонуклеотидные последовательности, отличающиеся одним нуклеотидом. Сигнал зависит в основном от стерической доступности ДНК-зонда, что заставляет использовать для его иммобилизации ковалентное связывание с концевыми нуклеотидными остатками.

Аффинные ДНК-сенсоры для определения низкомолекулярных соединений менее селективны, поскольку определяемые соединения реагируют с отдельными нуклеотидами или нуклеиновыми парами оснований. Поскольку в молекуле нативной ДНК присутствуют все нуклеотиды, в целом отклик аффинного ДНК-сенсора носит усредненный стохастический характер. То же относится к реагентам и физическим воздействиям, меняющим трехмерную структуру ДНК или расщепляющим фосфатный остов олигонуклеотида. Исключением являются способы контроля взаимодействий, использующие методологию иммуноанализа, согласно которой определяемое соединение или ДНК-зонд несет активную метку, дающую высокоспецифичный отклик (фермент, флуороген и т.д.). На рис.19 представлены некоторые варианты взаимодействия низкомолекулярных соединений с двухцепочечной ДНК.

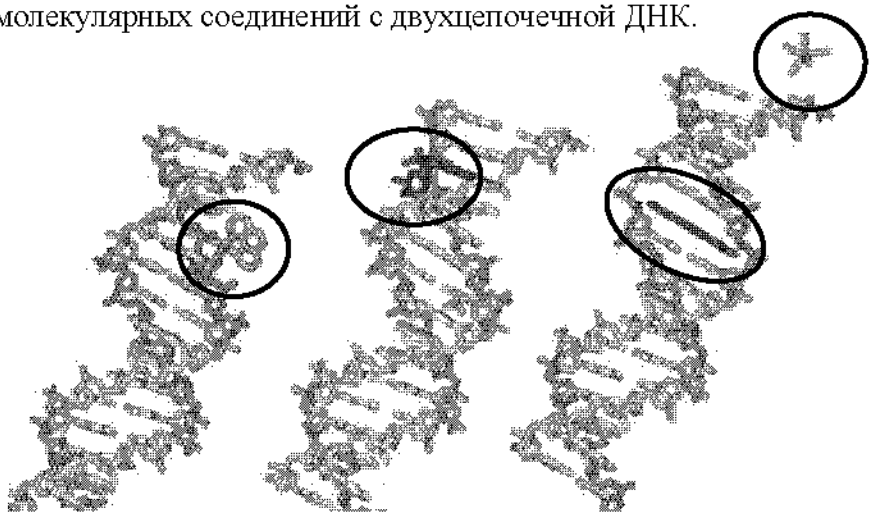


Рисунок 19. Схема взаимодействия низкомолекулярных соединений (выделены) с двухцепочечными олигонуклеотидами на поверхности золотого электрода. Слева направо: фенантролиновый комплекс иридия (III), дауномицин, метиленовый синий, феррицианид (III) калия

Комплексы переходных металлов координируются в области больших бороздок за счет образования донорно-акцепторных и водородных связей лигандов и центрального атома металла с пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. Плоские ароматические молекулы антрациклиновых противораковых препаратов (дауномицин, адриамицин), содержащие полярные или заряженные группировки в боковых цепях заместителей, взаимодействуют с комплементарными парами оснований, встраиваясь в области малых бороздок между парами Г-Ц. Их лекарственное действие связано с торможением процесса репликации и транскрипции ДНК. Небольшие плоские ароматические молекулы (фенотиазины) полностью укладываются внутрь спирали между параллельными парами нуклеотидных оснований. Этот процесс получил название *интеркаляции*, а вещества, способные к интеркаляции, называют *интеркаляторами*. К их числу относят также соединения, способные к частичному вхождению внутрь спирали (антрациклины). Отрицательно заряженные ферроцианиды сохраняют подвижность, локализуясь только по негибридизированным нуклеотидам вследствие электростатического отталкивания от фосфатного остова дуплекса ДНК.

5.1. Определение гибридизационных взаимодействий

Исторически первым способом определения биологических мишеней, комплементарных ДНК-зонду, располагающемуся на поверхности сенсора, явилось изучение ***электрохимической активности самой ДНК***. В определенных условиях все нуклеиновые основания ДНК проявляют электрохимическую активность. Однако их сигналы можно зарегистрировать только после полной денатурации биополимера, например, в сильнощелочных средах. В этих же условиях на медных электродах наблюдалось окисление сахаридных остатков ДНК.

В нейтральных растворах сигналы ДНК были впервые зарегистрированы ртутном электроде, после первичной денатурации можно получить анодные пики окисления гуанина на серебре и графитовых электродах. Поскольку сорбция ДНК на электроде приводит к резкому увеличению емкостной составляющей тока, аналитический сигнал получают

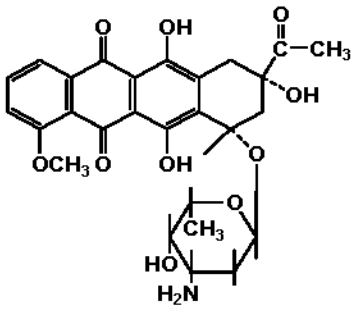
с использованием импульсной или дифференциально-импульсной вольтамперометрии.

Гибридизация снижает доступность гуанидиновых оснований в силу их участия в комплементарном связывании цитозина. Поэтому токи окисления гуанина после контакта ДНК-сенсора с биологической мишенью снижаются. Дополнительно повысить чувствительность определения комплементарных последовательностей можно, если в качестве ДНК-зонда использовать синтетический аналог, в котором гуанидиновые основания замещены инозиновыми. Они также способны к образованию комплекса с цитозином, но не окисляются на электроде. В результате после гибридизации все гуанидиновые основания на поверхности сенсора будут принадлежать только биологической мишени, и ток окисления будет пропорционален ее концентрации в анализируемой пробе.

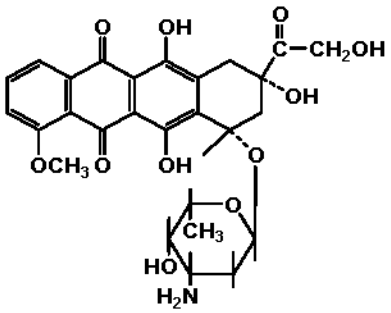
Чувствительность определения гибридизации во многом определяется способом иммобилизации ДНК-зонда в составе поверхностного слоя. Включение в полимерные матрицы снижает стерическую доступность центров связывания, поэтому предпочтение отдается сорбции олигонуклеотидов на поверхности электродов без носителя, включая электростатическую сорбцию при постоянном (поддерживающем) положительном потенциале, или ковалентной иммобилизации с участием концевых функциональных групп. Например, введение терминальных сульфгидрильных групп позволяет получить слои ДНК на золотом электроде с ортогональным расположением молекул, что облегчает процесс гибридизации. Плотность заполнения поверхности ДНК можно регулировать путем введения длинноцепочечных меркаптанов. Они же помогают подавить неспецифическую сорбцию ДНК, «подняв» их с поверхности электрода после ковалентной пришивки.

- Методы ковалентной иммобилизации ДНК-зонда на золоте использованы для создания ***пьезометрических ДНК-сенсоров*** для изучения процесса гибридизации путем прямого измерения массы поверхностного слоя. Пьезосенсоры позволяют определять пикограммовые количества мишени. Основным мешающим фактором является неспецифическая сорбция белков и некомплементарные олигонуклеотидов.
- Применение ***диффузионно свободных маркеров***. К ним относят низкомолекулярные вещества, способные к взаимодействию с ДНК и дающие характерный сигнал на трансдьюсере (рис.20). Их добавляют в раствор завершения гибридизации. Различают два способа использования маркеров. В первом определяют процессы взаимодействия ДНК и маркера, протекающие по механизму интеркалирования. При этом маркер включается в состав двунитевой ДНК, но не способен к аналогичному взаимодействию с

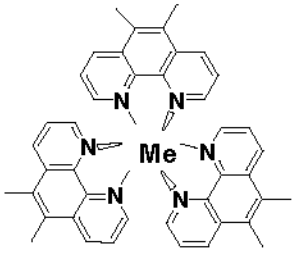
одноцепочечным зондом. Поэтому в присутствии комплементарной зонду мишени наблюдается изменение сигнала маркера.



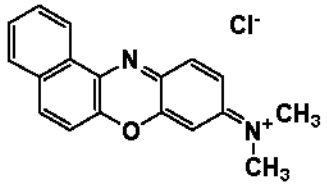
Дауномицин



Адриамицин



Фенантролиновый комплекс Os(II)



Meldola's Blue

Рисунок 20. Медиаторы электронного переноса, участвующие в генерировании амперометрического сигнала ДНК-сенсора

В том случае, когда маркер полностью включается в состав ДНК, наблюдается снижение его сигнала в силу ограничения подвижности. Так функционируют амперометрические ДНК-сенсоры с участием метиленового синего (структурная формула представлена на рис.15), дауномицина, адриамицина и фенантролиновых комплексов ионов переходных металлов. Если маркер в комплексе с ДНК сохраняет доступность для реакции на электроде, его накопление в ДНК увеличивает сигнал биосенсора. Аналогично можно использовать маркеры для оптических методов детектирования. Например, этидиум бромид - флуоресцентный маркер, интенсивность свечения которого меняется в зависимости от места его присоединения - по свободным гуанидиновым основаниям концевых фрагментов и разрывов ДНК, или по парам гуанин-цитозин.

Во втором способе устанавливают присутствие маркера в продукте гибридизации на поверхности сенсора с использованием дополнительного реагента. Например, присутствие метиленового синего в спирали двухцепочечной ДНК можно установить, если внести в раствор

феррицианид калия. Он не к взаимодействию с ДНК. Ток восстановления феррицианида на электроде, модифицированном двухцепочечной ДНК, мал, поскольку медиатор отталкивается от поверхности электрода отрицательно заряженный фосфатным остовом ДНК. Однако если ДНК-сенсор предварительно выдержать в растворе метиленового синего, то после его переноса в раствор феррицианида калия появляется ток, обусловленный переносом электрона молекулами фенотиазина, находящимися в составе спирали ДНК (рис.21). Помимо феррицианидов, можно использовать аммиакатные комплексы рутения(II), соединения осмия (II) и некоторые другие электрохимически активные соединения переходных металлов.

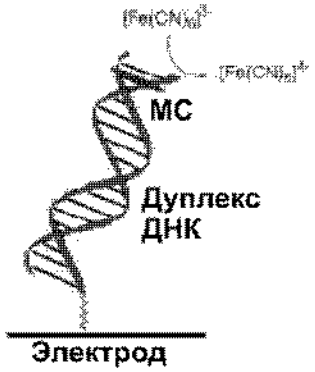


Рисунок 21. Схема применения гомогенного медиатора электронного переноса (феррицианид ион) для регистрации гибридизации нуклеотидов на поверхности золотого электрода в присутствии метиленового синего (МС)

Нативная ДНК способна сама переносить электроны по системе π-связей ароматических систем пар нуклеиновых оснований, частично перекрывающихся в спирали ДНК. Хотя эффективность этого процесса относительно невысока, этого достаточно, чтобы осуществить перенос электрона на расстояние, равное длине молекулы ДНК. Оно заведомо превосходит максимальное расстояние безмедиаторного переноса электрона на электрод. Это явление можно использовать для регистрации двухцепочечной ДНК по скорости переноса электрона. Например, редокс-индикатор Meldola's Blue, интеркалированный в двухцепочечной ДНК, может выступать как акцептор электронов, переносимых посредством ДНК с электрода. Электрокаталитический ток фиксируют, добавляя в раствор NAD^+. Скорость реакции можно также зафиксировать, если включить в состав поверхностного слоя NAD-зависимую оксидоредуктазу.

Во всех приведенных случаях регистрация сигнала находящегося в растворе (диффузионно свободного) индикатора наблюдается только в том случае, если происходит гибридизация ДНК-зонда и мишени. Наиболее эффективно определение короткоцепочечных фрагментов, включающих до 20 нуклеотидов. Для них практически отсутствует неспецифическое связывание нуклеотидов, принадлежащих одной цепи. Для более длинных

олигонуклеотидов часто происходит образование петель и пересечений цепи, мешающих их полному связыванию с комплементарным участком ДНК-зонда. Чтобы избежать этого, ДНК и длинноцепочечные олигонуклеотиды перед контактом с ДНК-зондом "отжигают" - подвергают термической денатурации, нагревая до 90-95°С.

В качестве диффузионно свободного медиатора электронного переноса может выступать белок цитохром *c,* способный к окислительно-восстановительным превращениям на электроде. Для регистрации сигнала маркера используют золотой электрод, покрытый мономолекулярным слоем цистамина. К электроду пришивают ДНК-зонд, в котором концевой остаток тиамина модифицирован карбоксильной группой (обозначение $T(COOH)_2$ на рис.22). Накопление цитохрома *c* происходит за счет электростатических взаимодействий отрицательно заряженной молекулы ДНК и положительно заряженного белка. При этом одноцепочечный ДНК-зонд не удерживает белок на поверхности электрода, а продукт его гибридизации с целевой одноцепочечной ДНК обладает более высокой плотностью заряда, за счет чего и происходит электростатическое накопление маркера вблизи поверхности электрода. В результате резко возрастает регистрируемый ток окисления цитохрома *c*. Схема функционирования ДНК-сенсора представлена на рис. 22.

Сигнал такого ДНК-сенсора очень чувствителен к нарушениям комплементарности в последовательности нуклеиновых оснований ДНК-зонда (иммобилизован на электроде) и биологической мишени в растворе. Если в силу нарушения комплементарности гибридизация не происходила, эффективность накопления цитохрома *c* резко снижалась. Поскольку все взаимодействия в процессе формирования сигнала биосенсора носили обратимый аффинный характер, ДНК-сенсор можно регенерировать, если разрушить продукт гибридизации, обрабатывая сенсор денатурирующими реагентами или нагревая в водном растворе сильных электролитов.

- Применение ***меченых*** компонентов биохимических реакций. Методология использования меток заимствована из иммунохимических методов определения гаптенов, точнее говоря, из непрямого конкурентного и сэндвичевого иммуноанализа. В качестве меток применяют производные ферроцена, бензохинона, фенотиазинов, которые ковалентно связывают с концевыми фрагментами ДНК-зонда или ДНК-мишени. Реакцией служит электрохимический сигнал, возникающий в силу пространственного сближения маркера и электрода в результате гибридизации.

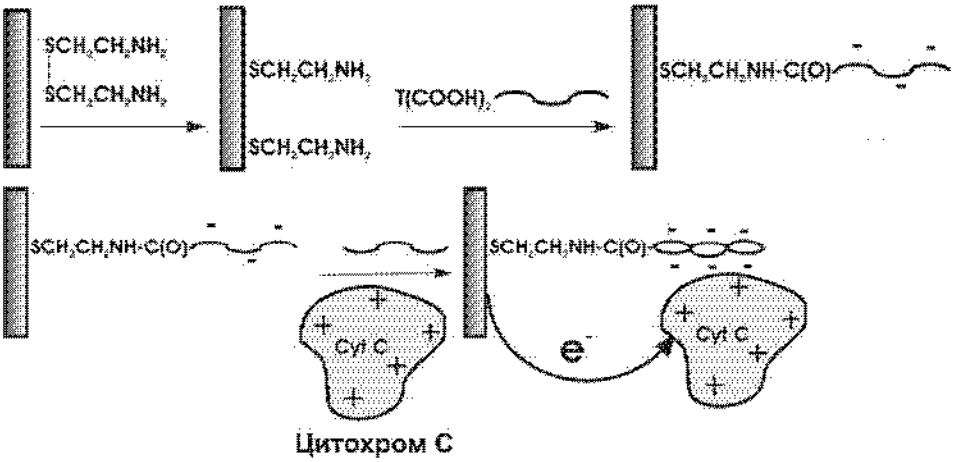


Рисунок 22. Схема формирования сигнала ДНК-сенсора с использованием цитохрома *c* в качестве медиатора электронного переноса

Аналогичным образом можно регистрировать флуоресцентные метки и даже получать устройства с визуальным детектированием сигнала о наличии комплементарных взаимодействий. Для этого после проведения гибридизации носитель, содержащий иммобилизованные компоненты, отмывают от избытка реагентов, после чего проводится определение оптического сигнала визуально или с помощью детекторов.

В оптических сенсорах с визуальной регистрацией сигнала в качестве маркера применяют коллоидные частицы золота или окрашенного латекса, невидимые в растворе, но придающие носителю характерный цвет после переноса на поверхность носителя при гибридизации с мишенью. Как правило, на наночастицах иммобилизованы не один, а тысячи олигонуклеотидов, что дает возможность многократного усиления сигнала.

Также высока чувствительность определения комплементарных мишеней с помощью ферментов, вводимых в состав ДНК-зонда (или мишени). В этом случае фиксация фермента вблизи преобразователя сигнала позволяет реализовать каталитический цикл превращения низкомолекулярного субстрата, продукт которого обладает электрохимической активностью или регистрируется с помощью оптических детекторов. Общая схема генерирования сигнала ДНК-ферментного сенсора приведена на рис.23.

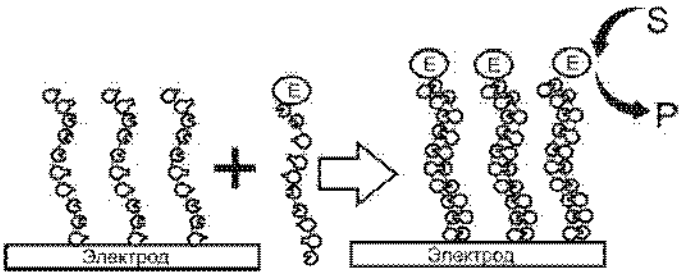


Рисунок 23. Схема генерирования сигнала ДНК-сенсора с помощью олигонуклеотидов, меченых ферментом E; на электроде производится определение концентрации продукта P ферментативного превращения субстрата S

Выбор фермента-метки достаточно традиционен для иммунохимических методов анализа. Чаще всего используют пероксидазу хрена (субстрат - *n*-аминофенол в электрохимических и люминол в люминесцентных сенсорах) или щелочную фосфатазу, катализирующую превращение α-нафтилфосфата. Образующийся при этом α-нафтол определяют по току окисления на электроде или спектрофотометрически.

Применение производных индола позволяет регистрировать гибридизацию с участием коньюгата щелочной фосфатазы визуально, по изменению окраски носителя, связанному с образованием окрашенного производного индиго. Использование нескольких различных коньюгатов позволяет проводить определение сразу двух мишеней в одном измерении. Возможно определение поверхностных концентраций электрохимически активных белков по реакции прямого электронного переноса на электрод. Например, цитохром b_5 , связанный через линкер с одноцепочечным олигонуклеотидом, менял свою окислительно-восстановительную активность в результате гибридизации. Процесс переноса электрона фиксировали по изменению спектра отражения поверхностного слоя или электрохимически.

Интересным вариантом ферментативного усиления сигнала гибридизации является сочетание ферментативной реакции и диффузионно свободного маркера. При использовании в качестве субстрата щелочной фосфатазы 5-бром-4-хлор-индолилфосфата в ферментативной реакции образуется производное индиго, нерастворимое в воде. Фермент ковалентно связывают с олигонуклеотидной последовательностью и в результате гибридизации включают в поверхностный слой, несущий гибридный двухцепочечный нуклеотид. Осаждающийся продукт блокирует перенос электрона между электродом и диффузионно свободным маркером -

феррицианидом. Такая схема позволяет обнаруживать до 10^{-14} М комплементарной мишени, что выше чувствительности электрохимического определения α-нафтола.

Разработан оригинальный кондуктометрический сенсор, в котором ДНК-зонд иммобилизовали на непроводящей подложке, разделяющей печатные электроды (рис.24).

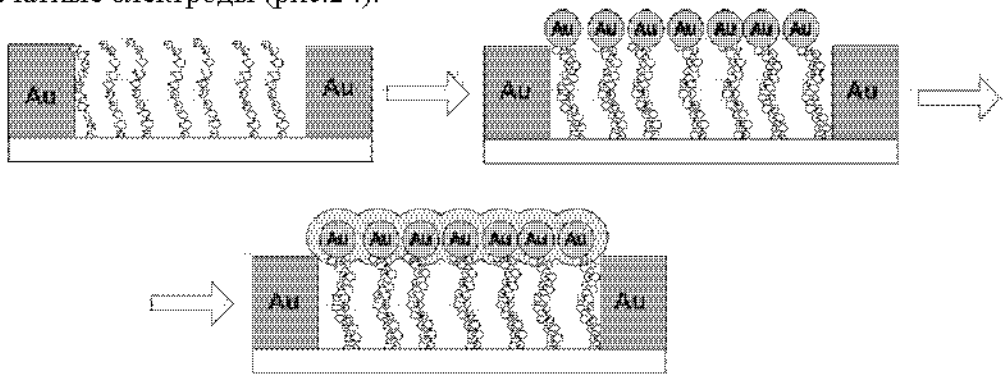


Рисунок 24. Планарный ДНК-сенсор; сигнал - снижение сопротивления зазора между электродами после гибридизации олигонуклеотидов, несущих наночастицы золота и химического осаждения на них серебра.

При миллиметровых размерах электродов зазор между ними составляет 20 мкм. В качестве метки используют коллоидные частицы золота, модифицированные тиолированными олигонуклеотидами, комплементарными ДНК-зонду. После гибридизации между электродами формируют сплошной слой коллоидного золота. В силу наноразмера частиц сопротивление слоя остается значительным. Чтобы получить хороший сигнал, после гибридизации биосенсор последовательно обрабатывают растворами нитрата серебра и гидрохинона. В результате химического восстановления ионов Ag^+ гидрохиноном на золоте осаждается серебро, образующее сверхтонкую проволоку, получившую название «молекулярной». В результате сопротивление резко падает. Слой серебра поверх наночастиц золота, зафиксированных на поверхности электрода путем гибридизационных взаимодействий соответствующих олигонуклеотидов, повышает чувствительность инверсионно-вольтамперометрического определения. В нем сигналом биосенсора служит ток растворения металла, закрепленного на поверхности сенсора. При равной массе чувствительность определения серебра в 25 раз выше чувствительности определения золота.

Микроэлектроды из сверхтонких золотых нитей, модифицированных ДНК-зондом, используют для высокочувствительного определения

гибридизации по изменению плотности поверхностного заряда. Для этого электрод инкубируют в растворе редокс-маркера (гексааминорутений (III) хлорид) и измеряют заряд поверхности до и после гибридизационных взаимодействий. В присутствии комплементарного олигонуклеотида емкость поверхностного слоя в отношении заряженного индикатора многократно возрастает. Особенностью данного ДНК-сенсора является чрезвычайно большая удельная поверхность рабочего электрода, представляющего собой фактически металлическую "щетку" из нанонитей золота. Его получают, осаждая золото в порах алюминиевого субстрата с его последующим растворением в концентрированном щелочном растворе.

- В ***сэндвичевых*** вариантах сначала производят накопление олигонуклеотидов-мишеней на твердом носителе, после чего на тот же носитель наносят меченый ДНК-зонд. После гибридизации образующийся продукт обрабатывают раствором фермента или флуорогена, присоединяющегося к зонду обычно посредством авидин-биотинового взаимодействия. После этого любым имеющимся способом определяют концентрацию метки (рис.25). Таким образом можно добиться чувствительности определения биологических мишеней, эквивалентной присутствию нескольких тысяч олигонуклеотидов в 10 мкл.

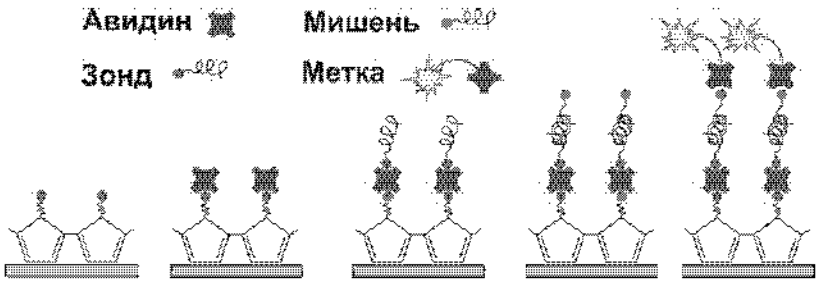


Рисунок 25. Сэндвичевый способ генерирования сигнала ДНК-сенсора на основе авидин-биотинового связывания

Эффективно также использовать биологическую мишень в качестве своеобразного связующего между основным, первичным зондом, называемым также праймером, и вторичным, несущим на себе метку. Схема такого определения представлена на рис.26.

Первичный ДНК-зонд иммобилизуют на поверхности электрода посредством авидин-биотинового связывания. Нуклеотидная последовательность первичного ДНК-зонда комплементарна концевому участку биологической мишени. После ее связывания ДНК-сенсор

обрабатывают вторым зондом, комплементарным свободному участку биологической мишени. После связывания второго зонда и отмывки непрореагировавших компонентов определяют концентрацию метки (фермента, флуорогена, электрохимически активного субстрата) с помощью электрохимического или оптосенсора.

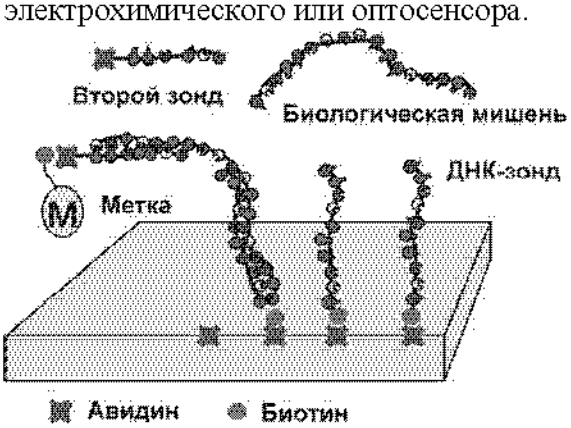


Рисунок 26. Схема включения метки в состав поверхностного слоя с помощью второго ДНК-зонда, комплементарного свободному участку биологической мишени

Формирование комплексов ДНК-зонд - мишень - меченый зонд можно проводить не только на поверхности датчика, но и в растворе, выделяя конечный продукт на поверхность носителя или трансдьюсера с помощью авидин-биотинового связывания или иммунохимических взаимодействий. Например, в приведенном выше примере в качестве метки можно использовать антиген. После перенесения комплекса из раствора на электрод его обрабатывают коньюгатом антител и индикаторного фермента. Активность фермента определяют спектрофотометрически (система пероксидаза - 4-аминоантипирин или тетраметилбензидин) или по уровню люминесценции (система пероксидаза - люминол).

Предложены также электрохимические ДНК сенсоры, в которых в качестве метки используют глюкозооксидазу, присоединяемую ко второму ДНК-зонду путем авидин-биотинового связывания.

- Вариант сэндвичевого ДНК-сенсора реализован в коммерческом продукте фирмы "Motorola" eSensor™. Он включает золотой микроэлектрод, на котором с помощью тиолированных соединений нанесен самоорганизующийся монослой, удерживающий первичный ДНК-зонд (обычно 25 нуклеотидов), частично комплементарный биологической мишени. Чтобы уменьшить стерические препятствия взаимодействия, ДНК-зонд вынесен за границы монослоя с помощью линкера - длинноцепочечного углеводородного фрагмента. После гибридизации сенсор обрабатывают вторым зондом, несущим в качестве метки ферроцен. Участок, комплементарный второму зонду, располагается вблизи связывания первичного зонда, так что метка закрепляется вблизи электрода.

В зависимости от модификации один ДНК-чип содержит 16 ли 32 микроэлектрода с общим противоэлектродом и электродом сравнения, что позволяет проводить одновременное определение соответствующего числа нуклеотидов. Это позволяет проводить не только диагностику вирусов и патогенных микроорганизмов, но и решать более сложные задачи - установление точеных мутаций или полиморфизма генов. Объем реагентов, необходимых для определения, составляет всего 100 мкл. Специализированное измерительное устройства eSensor 4800 позволяет регистрировать и обрабатывать сигналы с 48 чипов одновременно.

- Дополнительные возможности регистрации сигнала дают одноцепочечные олигонуклеотиды, в которых за счет частичного внутринитевого связывания комплементарных участков образуются петли (так называемые ДНК-шпильки, см. рис.27).

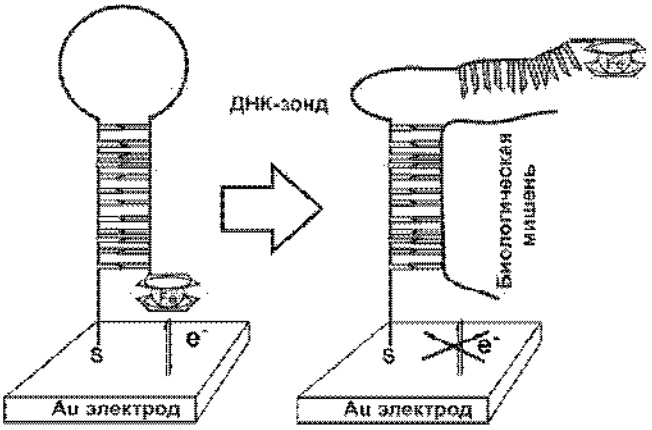


Рисунок 27. ДНК-сенсор на основе ДНК-зонда шпилечной структуры, меченого ферроценом

Такие олигонуклеотиды модифицируют по концевым нуклеотидам тиольной группой для пришивки к золотому электроду и электрохимически активной меткой, например, ферроцена. После пришивки на электроде на вольтамперограммах появляется пик обратимого окисления/восстановления пары ферроцен / ферроциний. Если такой сенсор нагреть для денатурации ДНК-зонда и обработать комплементарной последовательностью, сигнал метки пропадает, поскольку гибридизация приводит к пространственному разобщению метки и электрода, и перенос электрона становится невозможен. Если же биологическая мишень не комплементарна участку связывания ДНК-зонда, за счет спонтанной ренатурации конформация шпильки восстанавливается, и ферроцен вновь проявляет свою активность на электроде. На сходном принципе пространственного разобщения функционируют и флуорометрические ДНК-сенсоры, в которых на отдельных участках закреплены флуороген и супрессор. В кольцевой

конформации их близость препятствует флуоресценции за счет межмолекулярного связывания модифицирующих фрагментов. После денатурации и гибридизации с биологической мишенью жесткий двухцепочечный участок, как пружина, раздвигает концы зонда, разрушая комплекс и высвобождая флуороген. В результате регистрируется флуоресценция гибридизированного продукта, пропорциональная количеству свободных флуорогенов, т.е. концентрации биологической мишени, комплементарной ДНК-зонду.

Сэндвичевые методы имеют преимущество перед конкурентными схемами при определении высокомолекулярных молекул ДНК, для которых установление конкурентного равновесия достаточно продолжительно. Предел обнаружения высокополимерных ДНК в сэндвичевых методах анализа может составлять до 10^6 молекул ДНК при общей продолжительности измерения около 2 часов.

- Описаны варианты регистрации гибридизационных взаимодействий, основанные на т.н. исключении субстрата ферментативной реакции. С этой целью ДНК-зонд иммобилизуют на поверхности преобразователя сигнала или в полимерном носителе совместно с ферментом. Идея определения заключается в использовании стерических ограничений переноса субстрата, обусловленных формированием комплекса между ДНК-зондом и биологической мишенью. В результате такого взаимодействия образуется инертный комплекс и резко увеличивается диффузионное торможение переноса субстрата к ферменту (рис.28).

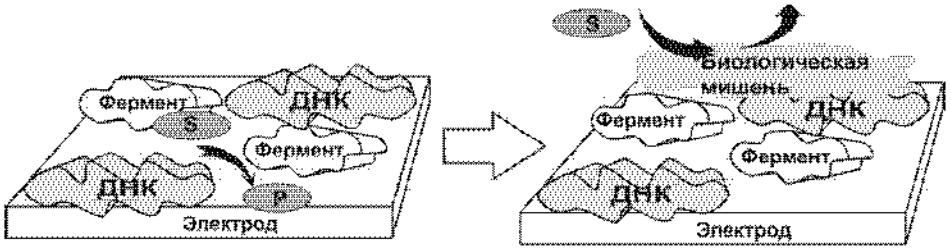


Рисунок 28. Определение гибридизации методом исключения субстрата. S и P - субстрата и продукт ферментативной реакции

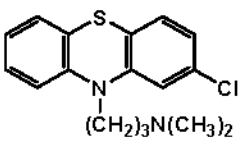
5.2. Определение низкомолекулярных соединений

Среди ДНК-сенсоров для определения низкомолекулярных соединений наибольший интерес вызывают биосенсоры для определения противораковых препаратов. Их используют как на предварительном этапе скрининга новых лекарств определенного механизма действия, так и в текущем биомедицинском контроле для оценки эффективности

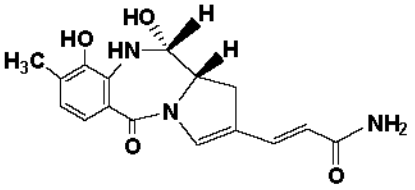
лекарственной терапии и подбора индивидуальной дозы достаточно токсичных противораковых препаратов. Действие лекарственных препаратов на процессы с участием ДНК происходит в основном по одному из следующих трех механизмов:

- контроль процессов транскрипции и активности полимераз (в этом случае лекарственный препарат реагирует с белками, связывающимися с ДНК);
- воздействие на стадии реакции ДНК с РНК, в том числе образование гибридных комплексов ДНК-РНК и триплексов двунитевой ДНК и РНК;
- прямое взаимодействие небольших плоских ароматических молекул с дуплексом ДНК, сопровождающееся их внедрением между стопками комплементарных пар оснований (интеркалирование).

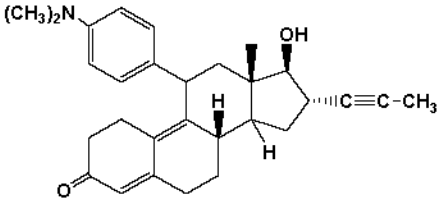
На рис.29 представлены структуры лекарственных препаратов, взаимодействие которых с ДНК изучали с помощью биосенсорных технологий. Структурные формулы дауномицина и адриамицина приведены на рис.20.



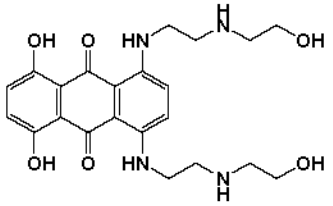
Хлоропромазин



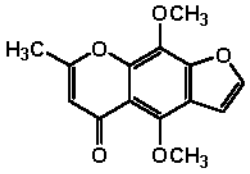
Антрамицин



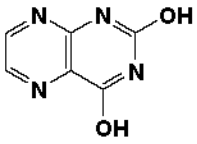
Мифепристон



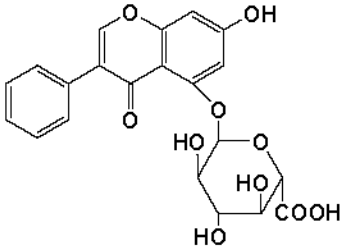
Митоксантрон



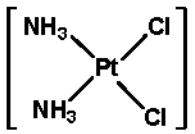
Келлин



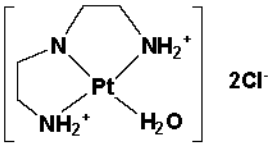
Люмазин



Байкалин



Цисплатин



Хлордиэтилентриаминоплатина (II)

Рисунок 29. Лекарственные препараты, влияющие на сигнал ДНК-сенсоров или используемые для регистрации такого сигнала

Характер сигнала ДНК-сенсора определяется механизмом взаимодействия указанных соединений с ДНК. Если молекула препарата полностью входит в дуплекс ДНК, происходит частичное или полное блокирование переноса электрона с низкомолекулярного компонента комплекса на электрод или гашение флуоресценции в оптосенсорах. Поэтому регистрируемый сигнал биосенсора уменьшается. В том случае, когда интеркалирование затрагивает только часть молекулы (антрациклиновые препараты), сигнал может или уменьшаться в силу частичного блокирования активного центра молекулы или увеличиваться, если окисляющиеся (флуорогенные) группы свободны, а их концентрация на преобразователе сигнала в силу комплексообразования с ДНК увеличивается.

Наиболее часто для определения лекарственных соединений с помощью ДНК-сенсоров применяются амперометрические сенсоры. Их характеристики приведены в табл.5. Стехиометрия и количественные характеристики связывания лекарственных препаратов с ДНК обычно известны, в том числе, благодаря исследованиям с применением биосенсорных технологий. Так, для дауномицина и нативной ДНК константа связывания составляет 2.35×10^5 M^{-1}, одна молекула дауномицина приходится примерно на шесть пар нуклеиновых оснований. Этот показатель варьирует в зависимости от нуклеотидного состава ДНК-зонда, так как антрациклиновые препараты координируются преимущественно по парам Г-Ц. В случае менее избирательного митоксантрона одна молекула препарата приходится на три пары нуклеиновых оснований. Несмотря на стерические препятствия взаимодействия, равновесие интеркаляции указанных препаратов достигается достаточно быстро (в течение минут).

Сигнал ДНК-сенсора может быть связан с изменением характеристик окисления/восстановления самого лекарственного препарата, или изменением пиков, относимых к нуклеотидам или продуктам их деградации.

Так, митоксантрон при продолжительном контакте с ДНК вызывает нарушения ее структуры, проявляющиеся в появлении пиков окисления

гуанина и аденина, до контакта в условиях эксперимента на вольтамперных кривых отсутствующих. При контакте ДНК с адриамицином появляется пик окисления, относимый к 8-оксогуанину, индикатору повреждения ДНК in vivo в условиях окислительного стресса организма.

В заключение приведем два подхода к определению низкомолекулярных соединений с использованием искусственных олигонуклеотидов, синтезированных с участием дополнительных нуклеотидов - урацила, инозина. Они обеспечивают не только специфическое связывание определенных соединений, но и задают нетипичную пространственную структуру зонда, определяемую не только комплементарными взаимодействиями (слабые водородные связи А-Т, Г-Ц), но и ковалентным связыванием отдельных нуклеотидов (Г-Г).

Таблица 7 . Характеристики амперометрического сигнала ДНК-сенсоров на лекарственные препараты

Лекарство	Характер сигнала
Дауномицин	Уменьшение тока пика окисления дауномицина
Адриамицин	Уменьшение тока пика окисления адриамицина, появление сигнала 8-оксогуанина
Митоксантрон	Увеличение тока пика окисления митоксантрона, появление пиков окисления гуанина и аденина в силу нарушения структуры ДНК
Тиоридазин	Увеличение пика окисления тиоридазина
Хлоропромазин, фенотиазин, прометазин	Увеличение пика окисления фенотиазинов в комплексе с ДНК, снижение тока пика окисления гуанина
Мифепристон	Увеличение пика окисления мифепристона в присутствии двухцепочечной ДНК
Байкалин	Увеличение тока пика окисления в присутствии двухцепочечной ДНК
Люмазин	Уменьшение тока пика окисления и смещение пика к более анодным потенциалам
Келлин, хлорохин	Увеличение тока окисления в присутствии нативой ДНК
Хиназолины	Снижение тока окисления фенантролинового

	комплекса кобальта (II)
Митомицин С, цистамин, хлордиэтилентриаминоплатина (II)	Снижение тока окисления гуанина
Антрамицин	Снижение тока окисления антрамицина
Цистамин	Изменение каталитического тока выделения водорода в присутствии ДНК и/или антител к ДНК
Рифампицин	Уменьшение тока пика окисления гуанина и аденина одно- и двунитевой ДНК

На рис.30 представлен способ определения ионов кадмия, основанный на каталитической активности подобных аптамеров. Индикаторная система состоит из двух цепей.

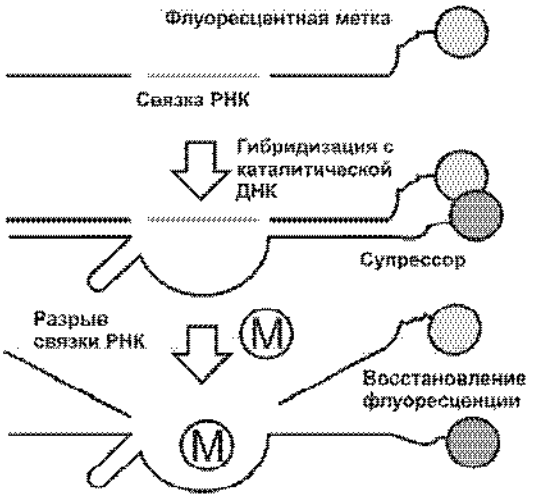


Рисунок 30. Схема селективного определения ионов кадмия по реакции регенерации уровня флуоресценции системы аптамер - субстрат (объяснение см. в тексте)

Одну из них называют субстратной, поскольку она выполняет функцию субстрата ферментативной реакции. Субстратная цепь состоит из двух олигонуклеотидных цепей, соединенных коротким фрагментом РНК. Одна из них несет метку - флуороген. Вторая - каталитическая - цепь состоит из двух участков, комплементарных олигонуклеотидам субстратной цепи, и располагающегося между ними каталитического центра. Каталитический центр представляет собой негибридизируемый участок, насыщенный остатками аденина и гуанина, который образует характерную

петлю. Участок, комплементарный олигонуклеотиду с флуорогеном содержит "антиметку" - супрессор, подавляющий флуоресценцию. Взаимодействие субстратной и каталитической цепей приводит к подавлению флуоресценции метки, поскольку супрессор в продукте реакции располагается вблизи метки. Если внести в систему ион кадмия, он занимает каталитический центр комплекса, активируя реакцию гидролиза вставки рибонуклеиновых фрагментов, это привод к развалу продукта гибридизации, в результате чего супрессор отдаляется от флуорогена, что приводит к восстановлению флуоресценции.

Второй пример основан на явлении т.н. индуцированной полем флуоресценции. В нем происходит межмолекулярный перенос энергии между индуктором, поглощающим возбуждающее излучение, и флуорогеном, излучающим избыток энергии при характерной длине волны. Особенностью индуцированной полем флуоресценции является требование определенной ориентации индуктора и флуорогена относительно друг друга без образования межмолекулярный связей. Такая ориентация достигается с помощью тройного комплекса аптамера и двух частично комплементарных олигонуклеотидов, несущих индуктор и флуороген (рис.31).

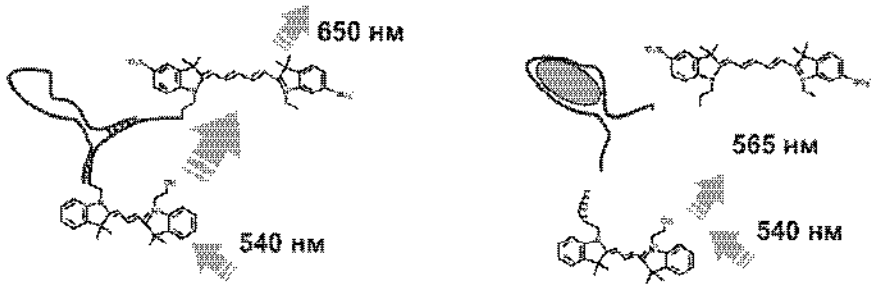


Рисунок 31. Схема определение теофиллина с помощью флуоресцентного аптасенсора

В результате индукции возбуждение флуоресценции при 540 нм приводит к вынужденному излучению при 650 нм. Аптамер содержит в своем составе энергетически богатые связи, образованные одноименными нуклеотидами (Ц-Ц, А-А), которые склонны к расщеплению. Молекула теофиллина захватывается полостью, образованной петлей некомплементарного участка аптамера. Такая конформация называется также "молоток", а полость - "головка". При этом образуются ковалентные связи между урациловыми основаниями головки и определяемым соединением. Изменение размера головки приводит к появлению дополнительных стерических напряжений в "ручке" молотка, в результате

чего энергетически богатые связи рвутся и комплекс распадается на три независимых фрагмента. Это, в свою очередь, приводит к нарушениям благоприятной ориентации индуктора и флуорогена и нарушению индуцированной флуоресценции. Вместо этого происходит обычная, прямая флуоресценция индуктора при другой длине волны - 565 нм.

Безусловно, указанные примеры могут показаться "стрельбой из пушки по воробьям": чрезвычайно сложные изощренные приемы геномики используются для определения очень простых соединений, для которых имеется масса обычных методов определения. Главное, на что следует обратить внимание - это универсальных разработанных механизмов генерирования аналитического сигнала и его детектирования. Селективность определения кадмия и теофиллина достигается путем подбора соответствующей конструкции аптамеров. Под конструкцией понимается не только состав нуклеотидной последовательности, но и их пространственная ориентация, достигаемая комбинацией ковалентных и нековалентных взаимодействий. Некоторые примеры аптамеров приведены

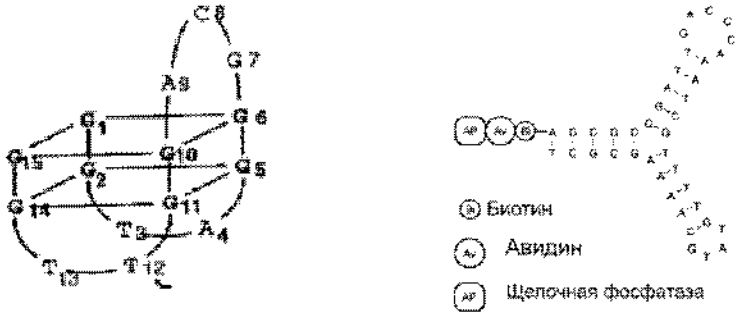


Рисунок 32. Аптамеры для определения тромбина (слева) и желчных кислот

В случае тромбина сигналом связывания выступает изменение флуоресцентной метки, присоединяемой к остатку T_{12}. Для определения желчных кислот используют измерение активности фермента щелочной фосфатазы, присоединяемой к аптамеру посредством авидин-биотинового связывания. Структура соответствующих аптамеров называется "этажерка" (создается за счет образования квадратов четырех ковалентно связанных гуанидиновых остатков) и уже упоминавшийся "молоток". Всего известных структуры аптамеров для определения примерно 250 соединений, многие из которых относятся к короткоцепочечным белкам - маркерам различных заболеваний, как тромбин.

5.3. ДНК-повреждающие факторы и загрязнители окружающей среды

Токсичные вещества взаимодействуют с ДНК, вызывая повреждения ее пространственной или первичной структуры или меняя характер взаимодействия ДНК с белками или комплементарными мишенями. Наряду с использованием ДНК-сенсоров для диагностики генетического материала данное направление развития биосенсорики считается приоритетным. В настоящее время развиваются два подхода к контролю загрязнения окружающей среды с использованием ДНК-сенсоров.

- Изучают влияние объекта контроля на сигнал окисления гуанидина. В состав сенсора включают двунитевые ДНК, например, из тимуса теленка, иммобилизованные на поверхности электрода щадящими способами, сохраняющими трехмерную структуру ДНК. Для оценки чувствительности ДНК-сенсоров в отношении генотоксикантов предложено использовать стандартные тесты на микроорганизмах, такие как Toxalert™ или Comet. Наблюдаемая корреляция между количественными показателями тестов и ДНК-сенсора для отдельных токсикантов оценивается как удовлетворительная.
- Индивидуальные токсиканты определяют после их накопления в реакции с ДНК на поверхности сенсора аналогично тому, как определяют лекарственные препараты.

Например, предложен способ определения никлозамида (2',5-дихлоро-4'-нитросалициланилид, средство против моллюсков) по пикам восстановления продуктов превращения исходного препарата, содержащих ароматические нитро- и нитрозогруппы. В присутствии ДНК процесс электрохимического расщепления никлозамида ускорялся, при этом появлялся пик 8-оксогуанина, связанный, по-видимому, с повреждающим действием на ДНК определяемого препарата. В этом примере ДНК выступает как селективный сорбент и усилитель сигнала биосенсора.

Повреждение нативной ДНК зафиксировано при контакте ДНК-сенсора с рядом триазиновых гербицидов (атразин, пропазин и др.). После длительного инкубирования на вольтамперограммах появлялись пики, отнесенные к окислению гуанина, гуанозина и аденозина однонитевых фрагментов ДНК. Процесс разрушения ДНК имеет необратимый характер.

Сходные результаты были получены с этидиум бромидом, уровень флуоресценции которого закономерно возрастает с увеличением доли некомплементарных однонитевых фрагментов, накапливающихся при нарушении структуры ДНК. Аналогичные доказательства повреждения ДНК в составе биосенсоров были установлены для ряда других потенциально токсичных соединений - комплексов железа (III) и меди (II), гидразидов, оксида стирола, бенз[а]пирена, гидроксильных радикалов, а также при действии повышенных температур и ионизирующего излучения.

Повреждающее действие на ДНК супероксидного радикала, токсичных металлов и их комплексов можно использовать для оценки защитного соединения так называемых антиоксидантов. К ним относятся природные и синтетические соединения, способные эффективно гасить свободнорадикальные процессы в живом организме за счет связывания активных свободных радикалов и образования стабильных малоактивных продуктов окисления. К числу природных антиоксидантов относятся витамин Е, таннины чая и др. К синтетическим антиоксидантам относят замещенные фенолы.

Содержание антиоксидантов оценивают по их влиянию на сигнал ДНК-сенсора, измеряемый в присутствии ДНК-повреждающего фактора. В качестве такового применяется реактив Фентона (смесь пероксида водорода и соли железа (III) в щелочной среде), фенантролиновые комплексы меди (II), ионизирующее излучение и т.д. При тестировании смеси антиоксидантов неизвестного состава, например, экстрактов из растений, продуктов питания, чая и т.д. содержание антиоксиданта может выражаться в единицах концентрации эталонного антиоксиданта, например, кверцитина.

5.4. Коммерциализация ДНК-сенсоров. ДНК-чипы и батареи сенсоров

Высокая специфичность биохимического отклика ДНК привела к быстрому развитию средств диагностики, получивших название ДНК-чипов (геночипов) и батарей ДНК-сенсоров (DNA Microarray). Их назначение различно и в зависимости от состава биохимических компонентов они применяются для изучения экспрессии генов, расшифровки последовательностей нуклеиновых оснований длинноцепочечных ДНК, определения точечных мутаций, распознавания больных и здоровых клеток, выявления фармацевтических и токсических соединений и т.д.

Основу батареи сенсоров составляет набор микропроб - точечных объектов, включающих несколько десятков тысяч олигонуклеотидов, циклических форм ДНК, продуктов полимеразной цепной реакции и т.д. Микропробы формируют на поверхности инертного шаблона - прозрачного пластика или кварцевой пластины. Высокая точность и специфичность связывания олигонуклеотидов микропроб достигается методами фотолитографии, применяемой при изготовлении микросхем. Для иммобилизации используют наиболее эффективные методы аффинного и ковалентного связывания. Например, в качестве матрицы применяют электрополимеризованные слои полипиррола, содержащие биотинированные мономеры. Ковалентно связанные молекулы биотина далее используют для связывания соответствующих зондов. Преимуществом метода является возможность получения оптически

прозрачных слоев, необходимых для последующего флуоресцентного определения взаимодействий ДНК-мишень.

Также применяют фотолитографические способы формирования батарей сенсоров, напыление носителей по типу струйной печати, методы травления и т.д. Всего на одном носителе могут располагаться десятки тысяч таких микропроб. Это устройство называют также биочипом, или геночипом. Сигналом о наличии или отсутствии связывания является изменение уровня флуоресценции, индуцируемой лазерным возбуждением. Лазер последовательно "опрашивает" отдельные микропробы, вынужденное излучение регистрируют с помощью светодиодной матрицы. Результат представляет собой так называемую "карту", отображающую уровень флуоресценции в виде матрицы значений. Возможно также прямое считывание с помощью чувствительной цифровой фотокамеры. Полученную картину сравнивают с результатами исследования здоровых клеток, выявляя тем самым не только отклонения генетического аппарата, но и локализацию мутировавшего (поврежденного) гена. Часто используют две метки, дающие свечение в зеленой и красной части спектра, что позволяет более надежно зафиксировать различия в эталонной и пробной карте и надежно выявить точечные мутации и места повреждений исходной молекулы ДНК, "нарезанной" на короткоцепочечные нуклеотиды. Такие подходы применяют в оценке генотоксических свойств различных объектов, направленном поиске лекарственных препаратов, обладающих высокой специфичностью связывания с ДНК возбудителя заболевания или раковой клетки.

Сходным образом был расшифрован геном человека. Сначала молекулу ДНК разделили на фрагменты, последовательность нуклеотидов которых расшифровали, сравнивая полученные фрагменты с библиотекой ДНК-зондов различной конфигурации. Тем самым был выявлен нуклеотидный состав сначала отдельных фрагментов, а затем и генома в целом. Эта технология расшифровки очень громоздка, учитывая огромное число нуклеотидов в ДНК человека, и без высокопроизводительных ДНК-чипов процесс расшифровки занял бы многие столетия.

Вопросы для самопроверки и углубленного изучения к главе 5

1. Каковы основные подходы к распознаванию одно- и двухцепочечной ДНК с помощью сенсорных технологий?
2. Что дает изучение взаимодействия ДНК с низкомолекулярных реагентами?

3. Назовите электрохимически активные интеркаляторы и способы их применения для измерения сигнала ДНК-сенсоров.
4. В чем различие понятий олигонуклеотид, аптамер, шпилька?
5. В чем преимущества электрохимических способов измерения сигнала ДНК-сенсоров?
6. Какие ДНК-повреждающие факторы можно определять с помощью интеркаляторов и как?
7. Почему в составе ДНК-сенсоров применяют дезоксирибонуклеиновые кислоты, а аптамеры чаще конструируют на основе библиотек рибонуклеиновых кислот?
8. Какие особенности имеют аптамеры как биохимические элементы распознавания в биосенсорах?

Глава 6. Микробные сенсоры

Микроорганизмы имеют ряд преимуществ перед другими биохимическими компонентами биосенсоров. В первую очередь, они касаются сравнения характеристик ферментных и микробных сенсоров, поскольку, как отмечалось в главе 1, микроорганизмы чаще всего применяют как источник определенной ферментативной активности. К таким преимуществам относятся:

- исключение дорогостоящих операций выделения и очистки ферментных препаратов;
- повышение устойчивости ферментов в живых клетках по сравнению с изолированными ферментами в силу сохранения привычного микроокружения и наличию систем репарации, включая биосинтез в процессе жизнедеятельности клеток и их деления;
- одновременное присутствие в клетке кофакторов, необходимых для функционирования фермента, а также систем их регенерации;
- возможность целенаправленной продукции требуемых ферментов с использованием генно-инженерных подходов;
- наличие простых и универсальных способов измерения активности ферментов по общим показателям жизнедеятельности клетки (респираторная активность, концентрация основных метаболитов, таких как ионы водорода, углекислый газ и аммиак).

Для включения ферментов в состав биосенсоров применяют практически исключительно нековалентные методы - физическую сорбцию и включение в гели. Ковалентная иммобилизация неприемлема, поскольку при этом применяют токсичные для живой клетки реагенты. Среди

электрохимических микробных сенсоров выделяют амперометрические, потенциометрические и кондуктометрические устройства.

6.1. Электрохимические микробные сенсоры

- ***В амперометрических микробных сенсорах*** используют в качестве датчика-трансдьюсера чаще всего кислородный электрод. Основным применением таких сенсоров является измерение суммарного содержания легко окисляющихся органически соединений, аналога гидрохимического показателя БПК. Поскольку данный показатель определяют скляночным методом после 5-суточного инкубирования тестируемых вод, он малопригоден для текущего производственного контроля. Микробные сенсоры для измерения БПК включают бактерии-деструкторы *Torulopsis candida*, *Trichosporon cutaneum*, *Pseudomonas putida*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus subtilis*, *Arxula adeninivorans*, *Serratia marcescens*, *Hansennula anomal*a, а также термофильные бактерии и дрожжевые грибы. Поскольку индивидуальные микроорганизмы характеризуются относительно узким спектром потребляемых органических субстратов, предпочтительнее использовать несколько различных штаммов, а также природные микробиологические сообщества, например, сообщество активного ила биологических очистных сооружений. Измеряемым сигналом служит изменение концентрации растворенного кислорода, регистрируемое после введения субстрата, тестируемых сточных вод однократно или постоянно (например, в процессе очистки стоков). В 1989 г. компания "Nisshin Denki" выпустила первый коммерческий БПК-тестер. В числе производителей значатся также "DKK Corp." (Япония), "Autoteam FmbH", "Prufgeratewerk Medingen GmbH", "Dr. Lange GmbH", "STIP Isco GmbH", "LARAnalytik and Umweltmesstechnik GmbH" (Германия), "Kelma" (Бельгия), "Bioscience, Inc.", "USFilter" (США). Микробные БПК-тестеры отличаются достаточно высокой устойчивостью сигнала (время жизни микробного слоя до двух месяцев) и сравнительно быстрым временем отклика (обычно до 10 мин.). Применение микробных реакторов увеличивает время отклика до 30-40 мин., но облегчает замену биологического компонента, суспензии микроорганизмов, помещаемых в колонку или рабочую ячейку такого биосенсорного устройства. БПК-тестеры калибруют по концентрации легко окисляющегося соединения (глюкоза, крахмал) или по растворенному кислороду.

Описаны также амперометрические микробные сенсоры для определения ряда индивидуальных соединений, преимущественно для использования в микробиологической промышленности, биотехнологии и в

контроле переработки пищевого сырья. Так, для определения этанола применяют биосенсоры на основе *Trichosporon brassicae*, *Acetobacter aceti*, *Candida vini*, *Gluconobacter suboxydans*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Pichia methanolica*. Они отличаются высокой чувствительностью, но низкой селективностью. Ее можно повысить, включая в систему медиаторы электронного переноса, специфичные для определенных метаболических путей. Например, в присутствии феррицианида можно выделить сигнал этанола в присутствии глюкозы (биосенсор на основе бактерий *Gluconobacter oxydans,* иммобилизованных в триацетате целлюлозы). Аналогичным образом действуют покровные полимерные мембраны, осуществляющие разделение субстратов по их размеру на этапе переноса к иммобилизованным микроорганизмам. Важным направлением повышения селективности сенсоров является использование генетически модифицированных микроорганизмов с индуктор-зависимой продукцией определенных ферментов. Например, предложен селективный способ определения ионов меди с помощью биосенсора на основе рекомбинантного штамма *S. cerevisiae,* содержащего плазмиды с Cu^{2+}-индуцируемым промотором *lacZ* гена. В присутствии ионов меди рекомбинантный штамм приобретает способность к окислению лактозы, что влечет увеличение потребления кислорода. Сходная схема предложена для определения ионов кадмия по его взаимодействию с промотором в рекомбинантной *E. coli* , вызывающему синтез β-галактозидазы. И в том, и в другом случае микробные сенсоры позволяют определять наномолярные концентрации металлов в течение нескольких минут.

Для определения глюкозы использовали мутантный штамм *E. coli K12* и *S. cerevisiae* в сочетании с кислородным микросенсором. Описано значительное количество микробных сенсоров для определения фенолоподобных соединений на основе *Rhodococcus erthropolis* и *Pseudomonas putida*. Адаптация микроорганизмов к определенным соединениям повышает селективность отклика. Например, был получен селективный биосенсор на *n*-нитрофенол с использованием бактерий *Arthrobacter JS 443* и *Moraxella sp.*, выделенных из сообщества почвенных микроорганизмов, отобранных на земельных участках вблизи химических производств, загрязненных нитрофенолами. Бактерии иммобилизовали на поверхности мембраны из нафиона или включали непосредственно в графитовую пасту.

Аналогичным образом предложено определять поверхностно-активные вещества с помощью адаптированных штаммов *Acetobacter peroxydans* и уксусной кислоты с помощью *Fusarium solani*. Разработаны промышленные микробные сенсоры для обнаружения биологической коррозии изделий из металла. В них использовали штаммы *Acetobacter sp.*, выделенные с

пострадавших от коррозии участков металлических конструкций производственных помещений.

Среди амперометрических микробных сенсоров, основанных на определении других продуктов ферментативной активности, следует выделить сенсоры для определения веществ нервно-паралитического действия. Они включают природные и рекомбинантный микроорганизмы, вырабатывающие фермент, катализирующий гидролиз органических эфиров фосфора. Это генетически модифицированные штаммы *Moraxella sp.* и *P. putida* с фосфатриэстеразой, локализованной на внешней липидной мембране клеток. Сигналом сенсора служит ток окисления *n*-нитрофенола, выделяющегося в результате гидролиза пестицида метафоса и ряда боевых отравляющих веществ. Известны также другие электрохимические и оптические способы регистрации активности данного фермента.

Другое приложение амперометрических микробных биосенсоров - определение соединений, угнетающих развитие микроорганизмов. Так, предложены биосенсоры для определения цианидов и синильной кислоты по подавлению респирационной активности *Nitrosomonas europaea*, *Thiobacillus ferrooxidans*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pseudomonas fluorescens.*

- ***Потенциометрические*** микробные биосенсоры обычно представляют собой модифицированные ион-селективные электроды и полевые транзисторы, модифицированные микроорганизмами. Для этого могут применяться природные или модифицированные микроорганизмы. Примером первого подхода служит определение органических эфиров фосфорной кислоты с помощью *Flavobacteium sp*. Описаны микробные сенсоры для определения этанола с помощью *S. ellipsoideus*, сахарозы с *S. cerevisiae* и трихлорэтилена с помощью адаптированного штамма *Pseudomonas aeruginosa.*

Рекомбинантная *E. coli* с плазмидами, кодирующими синтез β-лактамазы или пенициллинназы, была использована для определения соответствующих лекарственных препаратов. Аммиак-селективный электрод был использован для определения триптофана с помощью ауксотрофной бактерии *E. coli* WP2, для которой триптофан является фактором роста. Хлорид-селективный сенсор позволяет повысить селективность микробиального определения хлоралканов с помощью *Pseudomonas aeruginosa.*

Известны микробные сенсоры на основе электродов с газовым зазором (см. рис.8), в которых измеряют количества газов (аммиак, сероводород, диоксиды серы), выделяющиеся в процессе жизнедеятельности микроорганизмов. Их применяют для оценки метаболизма сульфат- и нитратредуцирующих микроорганизмов.

6.2. Микробные оптосенсоры

Строго говоря, системы оптического детектирования отклика микроорганизмов относятся не к биосенсорам, а к биосенсорным устройствам, поскольку чаще применяются к суспензиям микроорганизмов, т.е. микробным реакторам. Наиболее известны биолюминесцентные системы, в которых используются светящиеся бактерии, содержащие фермент люциферазу. Для активации гена *lux*, определяющего продукцию люциферазы, широко используют репортеры индукторного или конститутивного типа. В индукторных репортерах экспрессия гена определяется присутствием определяемого соединения. В результате уровень продукции люциферазы, а значит, и уровень биолюминесценции, зависит от концентрации активатора. К данному типу регуляции активности репортера относится описанное выше определение ионов кадмия и меди с помощью амперометрических микробных сенсоров (см. глава 6.1). Во втором случае промотор постоянно присутствует в живой клетке с активным метаболизмом, но его активность зависит от присутствия определяемого соединения, в зависимости от содержания которого происходит модуляция уровня биолюминесценции. Такой способ контроля обычно используют в обобщенной оценке загрязнения окружающей среды.

Токсичность ионов тяжелых металлов определяется их биодоступностью, поэтому микробные сенсоры дают более "реалистичные" показатели с точки зрения оценки биологического действия ионов металлов, чем методы химического анализа. Так, для оценки биодоступных количеств ионов никеля и кобальта предложен биолюминесцентный микробиологический сенсор на основе штамма *Ralstonia eutropha* AE2515, в который был внедрен регуляторный ген *cnr*YXH, связанный с репортерной системой *lux*CDABE. Для оценки концентрации ртути (II) использовали бактерии с модифицированным геномом, содержащим оперон *mer*R и систему *lux*CDABE. Промотор *mer* активируется при присоединении иона Hg^{2+} к *Mer*R, что приводит к появлению биолюминесценции. Сходные принципы формирования отклика генетически модифицированных микроорганизмов были использованы для определения биодоступных форм меди (*P. fluorescens*), неорганического фосфора (*Synechococcus*), оловоорганических соединений и галогенированных органических кислот.

Помимо индивидуальных соединений, экспрессия гена *lux* применяется для оценки общего стрессового состояния микроорганизмов, вызванного неблагоприятной внешней средой, а также обнаружения ДНК-повреждающих факторов. На этой основе разработаны и применяются в

биотестировании сенсоры на основе микроорганизмов, несущих плазмиды с геном *lux Vibrio fischeri*. Их люминесценция усиливается под действием токсичных соединений.

Аналогично регулированию продукции люциферазы (экспрессия гена *lux*) во флюоресцентных микробных сенсорах применяют генетически модифицированные микроорганизмы с геном *gfp*, кодирующим синтез т.н. зеленого флуоресцирующего белка (green fluorescent protein, GFP). Он очень стабилен и часто применяется в качестве индикатора различных воздействий на микроорганизмы. Главным недостатком GFP является наличие временного промежутка между синтезом белка и его флуоресценцией. Микробные биосенсоры на основе GFP используют для оценки содержания биодоступного для растений железа, определения арсенита, толуола и его производных, при мониторинга численности микробиологического сообщества и т.д. Флуоресцентное детектирование применялось также в сочетании с флуоресцирующими морскими микроорганизмами, свечение которых зависит от содержания растворенного кислорода. Степень тушения флуоресценции пропорциональна концентрации кислорода в его интервале концентраций 4-200 мг/л.

Вопросы для самопроверки и углубленного изучения к главе 6

1. В чем состоят преимущества микроорганизмов перед другими биохимическими компонентами биосенсоров?
2. Что является аналитическим сигналом при использовании микроорганизмов в составе биосенсоров?
3. Для определения каких веществ применяют амперометрические микробные сенсоры?
4. В каких случаях используют потенциометрические микробные биосенсоры?
5. Почему оптические микробные сенсоры относят к биосенсорным устройствам?
6. На каких принципах основано измерение сигнала в оптических сенсорах?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идея применения биологических реакций для решения задач биоанализа очень стара. Еще Авиценна предлагал опускать цветы в мочу больного и ставил диагноз по поведению бутонов. Гальвани изучал влияние ионного состава жидкости на электрофизиологический потенциал,

определяемый на мышце из бедра лягушки. В основе этих и многих других опытов лежала простая и интуитивно понятная идея - биологические реакции ценны тем, что позволяют прямо судить о состоянии организма и влиянии на него окружающей среды независимо от ее компонентного состава.

Развитие химических, а позднее инструментальных методов анализа, казалось, похоронило эту идею. Появилась возможность точно и быстро определять содержание каждого индивидуального вещества, каждого иона, что, казалось, сделало биологический анализ излишним. Но чем больше мы узнавали о биохимических особенностях функционирования живых систем, чем больше накапливалось информации о химическом составе клетки, тем сложнее была задача интерпретации огромного массива химической информации, тем сложнее было связать изменение десятков параметров химического состава с дисфункциями организма на молекулярном и надмолекулярном уровне.

С другой стороны, неожиданно выяснилось, что при решении тонких задач изучения молекулярного распознавания универсальные методы физико-химического анализа оказались настолько громоздки и дороги, что практически исключили соответствующие параметры из рутинного контроля состояния живых организмов, в первую очередь, из клинической практики и фармацевтики.

Все это привело к тому, что уже на новом витке развития науки ученые вернулись к тем биологическим объектам, с которых, собственно, и начинался биоанализ. Естественно, такое возвращение произошло на новом этапе, когда биологические реакции определяли не на глазок, а с помощью специализированных измерительных систем, исключающих субъективность восприятия и дающих количественную оценку измеряемого параметра. Так появились биосенсоры и биосенсорные технологии, сначала окрепшие в наиболее востребованных областях клинического анализа (определение глюкозы в крови и мочевины в моче), а затем нашедшие применение в решении фундаментальныхе проблем анализа генома клетки и контроля мутаций.

Сейчас биосенсорика выросла в мультидисциплинарную отрасль знания, активно использующую понятийный аппарат, технологические подходы и идеи аналитической химии, материаловедения, биотехнологии, биохимии и электроники. Безусловно, в небольшом по объему пособии невозможно охватить все области приложения биосенсоров. Так, в нем не отражены методы иммуноанализа с помощью биосенсорных подходов, микрофлюидные устройства, применение биосенсоров в микробиологической промышленности и анализе пищевых продуктов.

Некоторые из них подробно освещены в литературе, рекомендованной для углубленного изучения Основная задача, стоявшая перед авторами, заключалась в раскрытии основных идей создания биосенсоров, начиная с подбора биологического компонента и способа регистрации его реакции и заканчивая примерами их использования для решения конкретных аналитических задач.

Литература

1. Будников Г.К., Майстренко В.Н. Вяселев М.Р. Основы современного электрохимического анализа (Методы в химии). М.: Мир-БИНОМ, 2003. - 592 с.
2. Кулис Ю.Ю. Аналитические системы на основе иммобилизованных ферментов.// Вильнюс: Мокслас, 1981. 200 с.
3. Аналитическая химия. Проблемы и подходы. Под ред. Кельнера Р., Мерме Ж.-М., Отто М., Видмера Г.М. М. :Мир-АСТ, 2004. Т.1,2.
4. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология. М.: Академия, 2005. - 480 с.

Литература для углубленного изучения

1. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика. Практический курс. М.: Фаир-Пресс, 1999.- 720 с.
2. Кольман Я., Рем К.-Г. Наглядная биохимия. М.: Мир, 2000.- 469 с.
3. Биосенсоры: основы и приложения./ Под ред.Э.Тернера и др. М.: Мир, 1992.- 614 с.
4. Хаваш Е. Ионо- и молекулярноселективные электроды в биологических системах. М.: Мир, 1988.- 225 с.