

На правах рукописи

Степанова Вероника Борисовна

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ДНК-СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ
ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ И НАНОРАЗМЕРНЫХ
МЕДИАТОРОВ ЭЛЕКТРОННОГО ПЕРЕНОСА**

02.00.02 – Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань – 2013

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Евтюгин Геннадий Артурович

Официальные оппоненты: Майстренко Валерий Николаевич,
доктор химических наук, профессор,
заведующий кафедрой аналитической химии ГОУ
ВПО «Башкирский государственный универси-
тет», г.Уфа

Гармонов Сергей Юрьевич,
доктор химических наук, профессор,
профессор кафедры аналитической химии, серти-
фикации и менеджмента качества ФГБОУ ВПО
«Казанский национальный исследовательский
технологический университет»

Ведущая организация: ФГБУН «Научно-исследовательский институт
биомедицинской химии им.В.Н.Ореховича» Рос-
сийской академии медицинских наук (г.Москва)

Защита состоится «__» 2013 г. в на заседании диссертационного совета
Д 212.081.30 при Казанском (Приволжском) федеральном университете по адре-
су: ул. Кремлевская, 18, Химический институт им. А. М. Бутлерова КФУ, Бутле-
ровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачев-
ского Казанского (Приволжского) федерального университета.

Отзывы на автореферат просим направлять по адресу: 420008, г. Казань, ул.
Кремлевская, 18, КФУ, Химический институт им. А.М. Бутлерова.

Автореферат разослан «__» _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент

Казымова М.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Создание электрохимических ДНК-сенсоров является востребованным направлением современной биоаналитической химии. Его развитие обусловлено большой актуальностью проблем медицинской диагностики и экологического мониторинга, связанных с выявлением химических факторов, влияющих на ДНК и ее биохимические функции. К ним относятся промышленные мутагены и канцерогены, включая лекарственные препараты противоракового действия, активные формы кислорода, образующиеся в радикальных реакциях с участием различных токсикантов и промышленных загрязнителей, природные токсины и др. Помимо ДНК-чипов, ориентированных на расшифровку последовательности олигонуклеотидов, необходимо развивать средства количественного определения низкомолекулярных соединений, взаимодействующих с ДНК. Они требуют особых подходов к формированию биочувствительного слоя и регистрации аналитического сигнала в силу незначительности изменений состава поверхностного слоя по сравнению с гибридизацией олигонуклеотидов. Одним из способов решения указанных задач является применение медиаторов электронного переноса, меняющих характеристики окисления-восстановления в зависимости от характера биоспецифических взаимодействий на поверхности сенсора. Дальнейшее развитие указанных подходов требует расширения перечня медиаторов и исследования условий их включения в состав ДНК-сенсоров. Вышесказанное определяет актуальность диссертационной работы, направленной на совершенствование конструкции и способа измерения сигнала ДНК-сенсоров, предназначенных для биомедицинских целей и контроля загрязнения окружающей среды.

Целью диссертации явилось создание электрохимических ДНК-сенсоров на основе полиэлектролитных комплексов с включением электрополимеризованных компонентов и наноразмерных медиаторов электронного переноса и их использование для регистрации специфических взаимодействий с участием ДНК.

Для достижения указанной цели было необходимо поставить и решить **следующие задачи**:

1. Разработать способы получения полиэлектролитных комплексов ДНК на основе стеклоуглеродных электродов, модифицированных электрополимеризованными фенотиазиновыми красителями, и изучить их характеристики в реакциях переноса заряда.

2. Изучить влияние состава полиэлектролитного комплекса с включением

ДНК в реакциях с реактивом Фентона и оценить возможность регистрации повреждения ДНК по параметрам электрохимического импеданса.

3. Разработать способы получения наноразмерных медиаторов электронного переноса на основе поликарбоксилированных макроциклических носителей.

4. Предложить высокочувствительные способы определения соединений, взаимодействующих с ДНК, с помощью разработанных ДНК- и аптасенсоров на основе новых медиаторов электронного переноса.

Научная новизна работы заключается в том, что впервые:

- синтезированы новые полислоиные покрытия, включающие электрополимеризованные, полиионные компоненты и нативную ДНК и отличающиеся чувствительностью параметров электрохимического импеданса к окислительному повреждению ДНК;

- проведена оценка влияния состава полислоиных покрытий и способа включения в них ДНК на характеристики распределения заряда и устойчивость ДНК к действию реактива Фентона как модели окислительного повреждения ДНК;

- предложен новый тип наноразмерных медиаторов электронного переноса на основе макроциклических носителей с ковалентно связанным феназиновым красителем для создания амперометрических и импедиметрических сенсоров для определения специфических взаимодействий ДНК;

- разработан безреагентный способ регистрации биоспецифических взаимодействий ДНК, основанный на контроле межмолекулярного переноса электрона в пределах поверхностного слоя биосенсора.

Практическая значимость работы состоит в том, что:

- предложены простые и удобные в использовании способы формирования поверхностных модифицирующих слоев, содержащих ДНК и аптамеры, на стеклоуглеродных электродах;

- разработаны высокочувствительные способы обнаружения окислительного повреждения ДНК по параметрам электрохимического импеданса полиэлектролитных комплексов;

- предложены высокочувствительные способы определения тромбина, охратоксина А и аутоиммунных антител к ДНК с помощью разработанных электрохимических биосенсоров.

На защиту выносятся:

- результаты оценки влияния состава и способа нанесения полислоиных покрытий на характеристики переноса электрона;

- количественная оценка влияния окислительного повреждения ДНК на сопротивление переносу заряда и емкость слоя для полислоистых комплексов ДНК различного состава;

- электрохимическая характеристика наноразмерных медиаторов электронного переноса на макроциклических носителях;

- сравнительный анализ влияния конфигурации макроциклического носителя на характеристики определения тромбина с помощью аптасенсора с включением наноразмерных медиаторов электронного переноса;

- результаты определения аналитов, взаимодействующих с ДНК, в модельных водных растворах (тромбин, охратоксин А), искусственной сыворотке крови (тромбин) и в образцах сыворотки крови здорового донора и больных аутоиммунным тиреоидитом (аутоиммунные антитела к ДНК).

Апробация работы. Результаты исследований докладывали на Съезде аналитиков России «Аналитическая химия - новые методы и возможности» (Москва, 2010), Международной конференции по электрохимическим сенсорам «Матрафюред – 2011» (Будапешт, 2011), 5 Международном симпозиуме «Биосенсоры для пищевой безопасности и экологического мониторинга» (Урзат, Марокко, 2011), VIII Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2012» (Уфа-Абзаково, 2012), Итоговой научной конференции Казанского (Приволжского) федерального университета (2012), Конференции аспирантов, молодых ученых Научно-образовательного центра Казанского государственного университета "Материалы и технологии 21 века" (2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 3 статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендуемых ВАК, и тезисы 6 докладов на международных, всероссийских и региональных конференциях.

Личный вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состоял в постановке и решении основных задач, проведении основных экспериментальных исследований в области создания электрохимических ДНК-сенсоров на основе полиэлектролитных комплексов и наноразмерных медиаторов электронного переноса, изучении их вольтамперных и импедансных характеристик, их интерпретации, проведении измерений сигнала ДНК-сенсоров в отношении белков (тромбин, аутоиммунные антитела) и охратоксина А, анализе и систематизации полученных результатов.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 126 стр. компьютерной верстки, включает 31 рисунок и 12 таблиц. Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов и списка использованных библиографических источ-

ников, включающего 211 ссылок на отечественные и зарубежные работы.

Диссертация выполнена при поддержке РФФИ (гранты № 09-03-00309-а «Новые электрохимические сенсоры и биосенсоры на основе медиаторных систем для обобщенной оценки объектов сложного состава» и 11-03-00381-а «Амплификация сигнала электрохимических (био)сенсоров путем самосборки полиэлектролитов с включением наноразмерных медиаторных систем»), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (гос.контракт №16.740.11.0496 «Электрохимические ДНК-сенсоры для детектирования белков и токсинов на основе наноразмерных медиаторных систем»), Национальной стипендиальной программы Словацкой Республики, Совета по грантам Президента РФ для поддержки молодых российских ученых и ведущих научных школ. В работе использовали оборудование Федерального центра коллективного пользования уникальным научным оборудованием Казанского (Приволжского) федерального университета (гос.контракт № 16.552.11.7008).

Во **Введении** раскрыта актуальность темы исследования, определены цели и задачи, сформулированы научная новизна, практическая значимость и положения, выносимые на защиту.

В **Литературном обзоре** (глава 1) рассмотрены особенности функционирования электрохимических ДНК- и аптасенсоров и применение в их составе электрополимеризованных материалов и полиэлектролитных комплексов. Анализ литературных данных обосновывает актуальность темы диссертации и новизну предлагаемых решений в области создания электрохимических ДНК-сенсоров.

В **Экспериментальной части** (глава 2) представлены данные об объектах исследования, используемых методах и измерительном оборудовании, приведены условия формирования чувствительного слоя разработанных биосенсоров, условия измерения и способы обработки сигнала в отношении определяемых соединений.

Главы 3-5 посвящены обсуждению полученных результатов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Экспериментальная часть

Для регистрации сигнала ДНК-сенсоров использовали красители Метиленовый синий (МС), Метиленовый зеленый (МЗ) и Нейтральный красный (НК) в составе полимерных покрытий, получаемых путем электрополимеризации при многократном сканировании потенциала или в случае НК – ковалентно связан-

ный с помощью карбодиимидной сшивки с поликарбоксилированными тиакаликс[4]аренами (ТКА). Для получения полиэлектролитных комплексов использовали нативную ДНК из молок лосося, полистиролсульфонат (PSS, средняя мол. масса 70 000 Д) и поли(аллиламин гидрохлорид) (РАН, средняя мол. масса 15 000 Д).

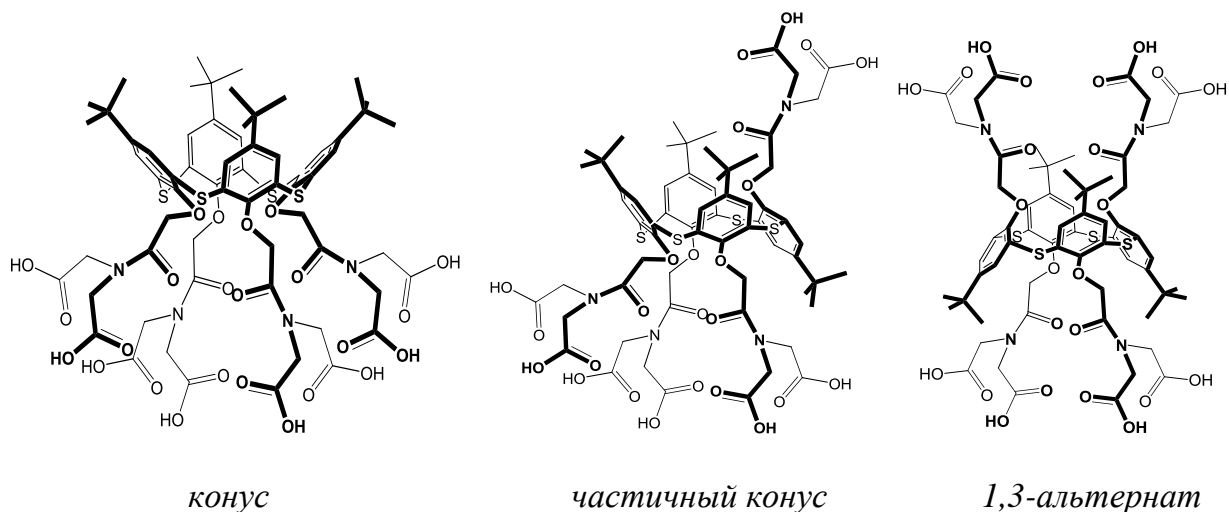


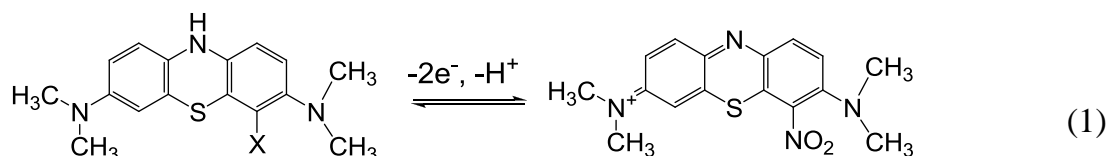
Рисунок 1 – Структуры ТКА, использованные в работе

Электрохимические измерения проводили с помощью потенциостата-гальваностата AUTOLAB PGSTAT 302N (Metrohm Autolab b.v., Нидерланды) и электрохимического анализатора CHI 440 В (CH Instruments, США). В качестве рабочего электрода использовали стеклоуглеродный электрод, противоэлектрода – платиновую проволоку, электрода сравнения хлоридсеребряный электрод Ag/AgCl. Обработку результатов электрохимических измерений проводили с помощью программы GPES 4.9 и Nova 2.2 («Metrohm Autolab b.v.»).

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ДНК-СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДНК

Электростатические взаимодействия с участием ДНК позволяют получать устойчивые полиэлектролитные комплексы, в которых ДНК сохраняет свою нативную структуру и способность взаимодействия с низкомолекулярными реагентами. Для создания полиэлектролитных комплексов с включением ДНК стеклоуглеродный электрод сначала модифицировали полимерной формой МС или МЗ, после чего на поверхность последовательно наносили растворы полиэлектролитов PSS и РАН и ДНК с чередованием заряда слоя с промежуточной отмывкой несвязавшихся компонентов и высушиванием. Контроль электрополимеризации проводили, регистрируя циклические вольтамперограммы в раство-

рах мономеров красителей. По результатам измерений электродная реакция сопровождается переносом двух электронов и одного иона водорода. Продукт полимеризации проявляет электрохимическую активность при -200...250 мВ.



MC: X=H, M3: X=NO₂

Подобраны рабочие условия полимеризации по интервалу сканирования потенциала и pH, предложено проводить стабилизацию полученного покрытия путем его поляризации при анодном потенциале с последующим многократным сканированием потенциала в рабочем буферном растворе в отсутствие мономера для удаления непрочно связанных компонентов из полимерной пленки. По зависимости тока пика от скорости сканирования потенциала установлен поверхностный характер лимитирующей стадии в силу сорбционной активности феноптиазинов. Эффективную концентрацию активных форм красителей на электроде рассчитывали по ур. (2).

$$I_p = (n^2 F^2 \nu A \Gamma) / (4RT), \quad (2)$$

где I_p – ток пика, n – число электронов, участвующих в электродной реакции, A – площадь электрода, Γ – поверхностная концентрация феноптиазина и ν – скорость сканирования потенциала, гетерогенную константу скорости переноса электрона k^0 и коэффициент переноса α – по ур. Лавирона (3).

$$E_p = E^{0'} + \left(\frac{RT}{\alpha n_a F} \right) \ln \left(\frac{RTk^0}{\alpha n_a F} \right) + \left(\frac{RT}{\alpha n_a F} \right) \ln \nu \quad (3)$$

Параметры электронного переноса приведены в табл.1. Найденное значение поверхностной концентрации согласуется с величиной, полученной путем интегрирования циклических вольтамперограмм (2.2 и 1.2 наномоль мономера /см² для поли-МС и поли-МЗ, соответственно).

Таблица 1. Электрохимические характеристики электронного переноса на электродах, модифицированных поли-МС и поли-МЗ. P < 0.05. Измерения на 6 индивидуальных электродах

| Модификатор | Γ , наномоль/см ² | α | k_s , с ⁻¹ (100 мВ/с) |
|-------------|-------------------------------------|-----------|------------------------------------|
| Поли-МС | 1.8±0.1 | 0.65±0.15 | 0.34±0.06 |
| Поли-МЗ | 1.3±0.3 | 0.72±0.22 | 0.17±0.03 |

Включение ДНК в состав поверхностного слоя независимо подтверждено с помощью флуоресцентной микроскопии по накоплению флуоресцентного красителя SYBER GREEN I, наблюдаемому только в присутствии ДНК в слое.

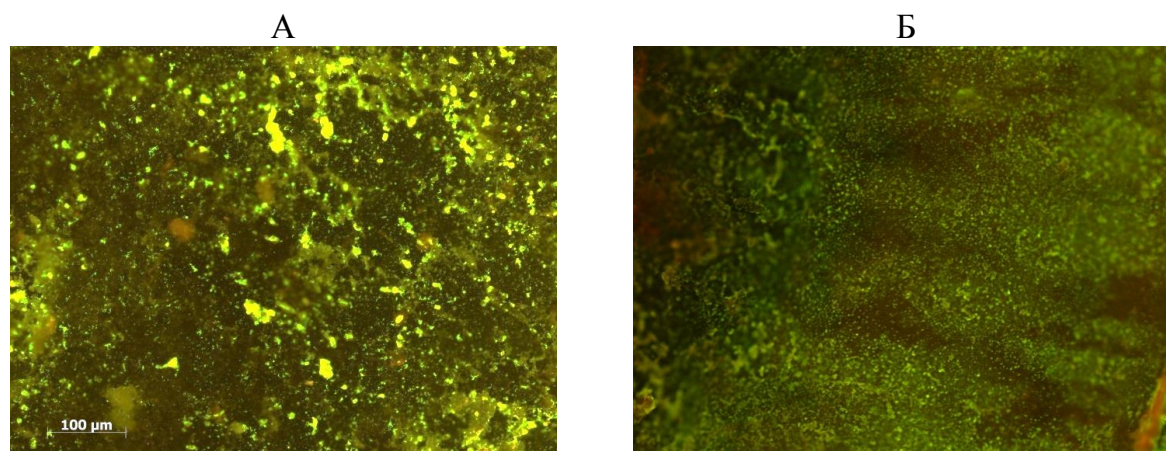


Рисунок 2 – Флуоресцентные снимки полиэлектролитных комплексов PSS-РАН-ДНК на электродах, модифицированных поли-МС (А) и поли-МЗ (Б).
20-кратное увеличение

Введение в состав поверхностного слоя полиэлектролитов сохранило обратимость электронного переноса в слое полифенотиозинов, что было подтверждено потенциометрическими и вольтамперометрическими измерениями.

Характеристики электрохимического импеданса (сопротивление переноса заряда R_{et} и емкость слоя C) для эквивалентной ячейки Рэндлса $R(RC)$ приведены в табл.2 ($n = 6$, $P < 0.05$). Измерения проводили в присутствии 0.01 М $K_3[Fe(CN)_6]$ и 0.05 М $K_4[Fe(CN)_6]$ при 0.105 В отн. Ag/AgCl в интервале частот 0.04 Гц - 100 кГц и амплитуде 5 мВ.

Таблица 2. Характеристики электрохимического импеданса полиэлектролитных комплексов на стеклоуглеродных электродах, покрытых поли-МС и поли-МЗ. PSS-РАН; 2 – ДНК-РАН; 3 – PSS-РАН-PSS; 4 – PSS-РАН-ДНК; 5 – ДНК-РАН-PSS

| Комплекс | Поли-МС | | Поли-МЗ | |
|----------|----------------|-----------|----------------|-----------|
| | R_{et} , кОм | C , мкФ | R_{et} , кОм | C , мкФ |
| 1 | 23.5±2.2 | 4.5±0.4 | 39.8±2.0 | 45.0±2.5 |
| 2 | 13.7±1.2 | 46.0±1.0 | 39.4±2.5 | 50.3±4.2 |
| 3 | 20.9±1.4 | 3.9±0.4 | 78.6±5.3 | 47.2±3.2 |
| 4 | 22.1±2.0 | 3.6±0.5 | 72.3±4.7 | 47.2±2.3 |
| 5 | 17.7±1.8 | 4.8±1.2 | 81.6±5.5 | 46.1±1.2 |

Для поли-МС введение ДНК в слой снижает R_{et} в 1.5 раза, для поли-МЗ сопротивление определяется исключительно числом слоев полиэлектролита. Ем-

кость слоя меняется менее регулярно. В случае слоя поли-МС-ДНК-РАН высокое значение емкости может быть связано с нескомпенсированностью заряда ДНК в силу ее специфических взаимодействий с полифенотиразином, увеличивающих количество биополимера в слое по сравнению с поли-МЗ.

Измерение импеданса для модели $R(RC)(RC)$ показало, что в случае поли-МС сопротивление границы электрод-полиэлектролит меньше, чем на границе полиэлектролит – раствор в силу электрохимической активности поли-МС. Емкость внешней границы раздела слабо зависит от числа слоев и наличия в них ДНК. Для поли-МЗ различие емкости на внешней и внутренней границе поверхностного слоя незначительно, что подтверждает небольшой собственный заряд поли-МЗ, не оказывающий влияния на распределение заряда в пределах слоя.

ДНК-сенсор на основе полиэлектролитных комплексов ДНК использовали для оценки окислительного повреждения ДНК под действием реактива Фентона (FeSO_4 (NaOH, ЭДТА) / аскорбиновая кислота / H_2O_2). Предварительно было установлено сохранение цельности поверхностного слоя биосенсора в щелочной среде, используемой для генерации супероксидных анионов, а также постоянство электрохимических характеристик полифенотиразинов при воздействии активных форм кислорода. Результаты измерения импеданса приведены на рис.2.

Для покрытий на основе поли-МС, содержащих ДНК, действие активных форм кислорода увеличивает R_{et} и C со временем инкубирования, возможно, в силу нарушения плотности связывания компонентов. Для комплекса **2** 5-мин. экспозиция в реактиве Фентона несколько уменьшала емкость слоя, по-видимому, за счет дополнительной компенсации заряда ДНК при окислении пленки. В случае поли-МЗ величины R_{et} и C в течение 5 мин. инкубирования в реактиве Фентона менялись незначительно. Исключением является слой **4** с внешним слоем ДНК, для которого величина R_{et} резко снижается, по-видимому, в результате частичного нарушения блокирования электрода и облегчения доступа к нему феррицианид-иона. Напротив, увеличение емкости выражено существенно слабее, чем в случае комплексов на основе поли-МС, причем максимальные изменения наблюдаются для тех покрытий, в которых ДНК непосредственно контактирует с полифенотиразином.

Установление параметров импеданса в рамках модели $R(RC)(RC)$ показало уменьшение емкости внутреннего контакта электрод – полиэлектролит для поли-МС, непосредственно контактирующего с ДНК. Это подтверждает предположение, что активные формы кислорода влияют на характеристики импеданса путем изменения степени разделения заряда в слоях комплекса и частичного окисления

полимерной подложки. Максимальное абсолютное значение емкости C и максимальный ее сдвиг в 5-мин. инкубировании наблюдался для слоя PSS-РАН-ДНК, что отвечает более высокой плотности заряда в молекулах ДНК по сравнению с синтетическими полиэлектролитами.

На внешней границе раздела воздействие реактива Фентона увеличивает R_{et} на 40-150% в зависимости от состава комплекса.

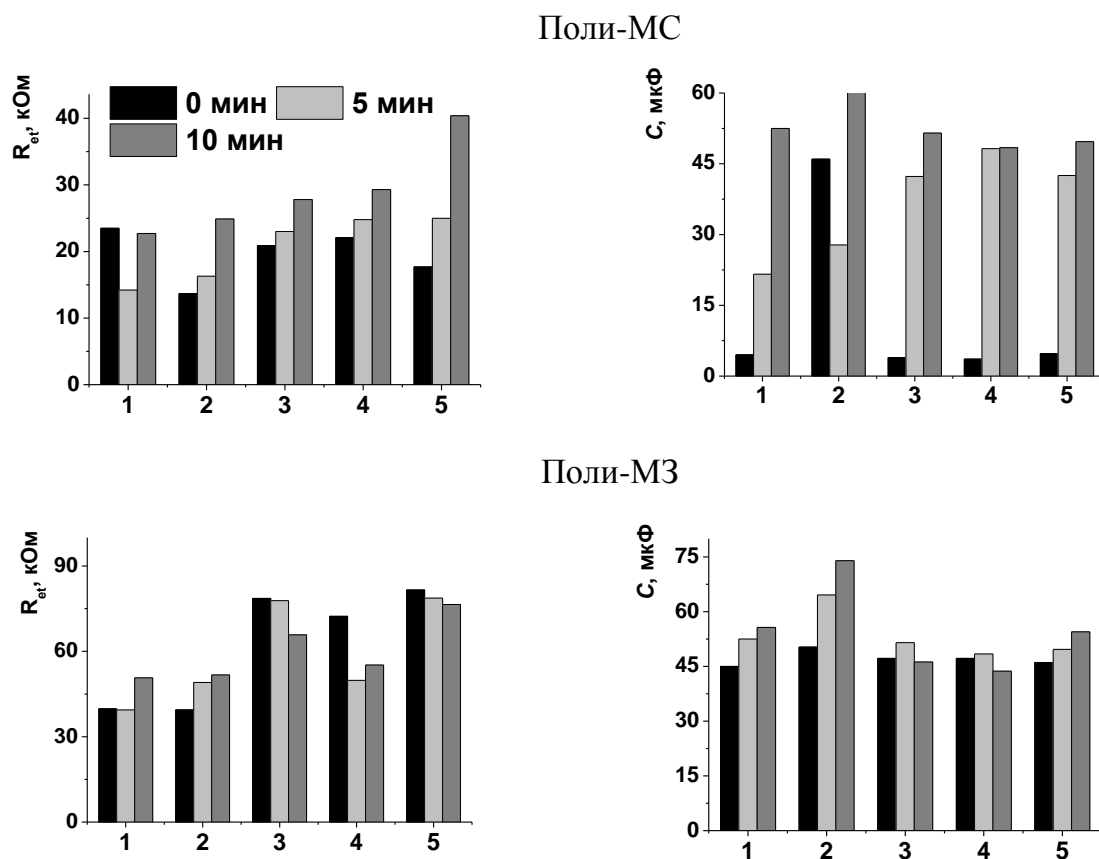


Рисунок 2 – Влияние реактива Фентона на характеристики электрохимического импеданса полиэлектролитных комплексов на основе полифенотиазина.

1 – PSS-РАН; 2 – ДНК-РАН; 3 – PSS-РАН-PSS; 4 – PSS-РАН-ДНК; 5 – ДНК-РАН-PSS

Для 5-мин. инкубирования смещение сопротивления наблюдается в основном для покрытий на основе поли-МЗ даже в том случае, если они не содержат ДНК, т.е. в результате прямого окисления полифенотиазина. В присутствии ДНК наблюдаемые изменения многократно больше, особенно при прямом контакте полифенотиазина и ДНК. Полиионные комплексы без ДНК практически не реагируют на увеличение продолжительности контакта, тогда как в присутствии ДНК, особенно при прямом контакте ДНК и полифенотиазина, изменения носят прогрессирующий характер. Это позволяет разделить вклад окисления подложки и ДНК на параметры импеданса ДНК-сенсора (рис.3).

Покрyтия на основе поли-МС показали меньшее абсолютное увеличение сопротивления, но более высокую селективность отклика по сравнению с поли-МЗ. Величина R_{et} слоев, не содержащих ДНК, не менялась в течение первых 5 мин. инкубирования и далее, при увеличении времени инкубирования до 10 мин., увеличивалась незначительно.

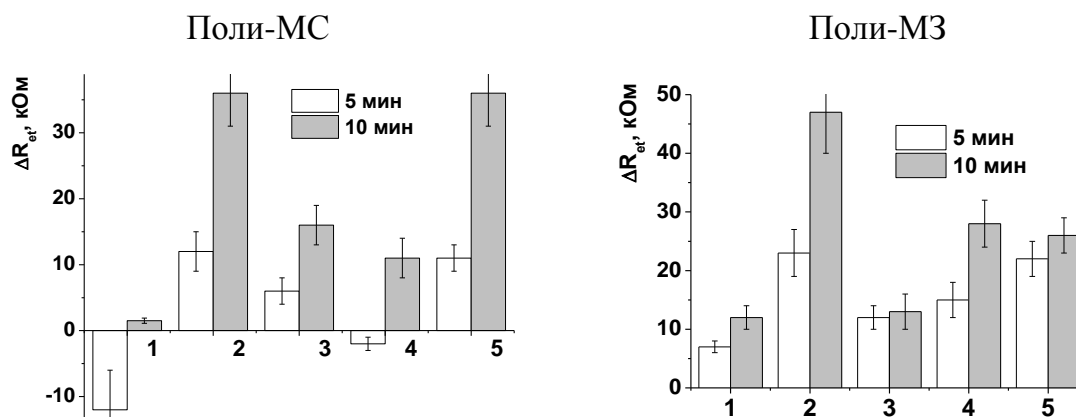


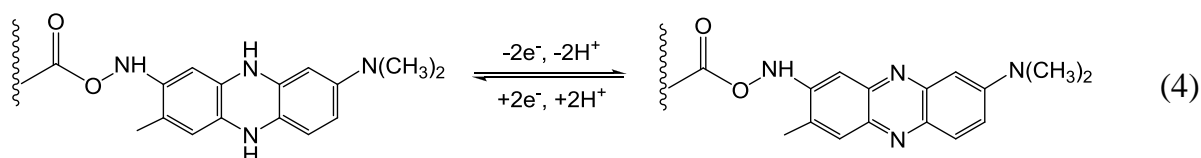
Рисунок 3– Изменение R_{et} электродов, модифицированных полифенотиазинами и полиэлектролитными комплексами, после 5- и 10-мин. экспозиции в реактиве Фентона: 1 – PSS-ПАН, 2 – ДНК-ПАН, 3 – PSS-ПАН-PSS, 4 – PSS-ПАН-ДНК, 5 – ДНК-ПАН-PSS

Сравнение динамики изменения параметров импеданса на внутренней и внешней границах раздела позволяет заключить, что основной вклад в них вносит повреждение ДНК. Сравнение результатов, полученных с комплексами на основе поли-МС и поли-МЗ, увеличивает надежность диагностики воздействия активных форм кислорода на ДНК. Это позволяет использовать разработанные ДНК-сенсоры для контроля потенциального генотоксического действия химических и физических факторов среды.

АПТАСЕНСОРЫ НА ТРОМБИН НА ОСНОВЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ МЕДИАТОРОВ ЭЛЕКТРОННОГО ПЕРЕНОСА

Аптамеры – синтетические олигонуклеотиды, обладающие высокой аффинностью к анализам, сопоставимой с избирательностью антител. Аптамеры на тромбин часто используют для разработки аптасенсоров на основе новых принципов регистрации сигнала. Кроме того, тромбин участвует в регуляции процессов свертываемости крови и ее коагуляции. Его анализ необходим на предоперационной и послеоперационной стадиях хирургического вмешательства. Для со-

здания аптасенсора использовали аптамер 5'-GGT TGG TGT GGT TGG TTT TTT TTT TTT TTT 3'-NH₂, который ковалентно пришивали с помощью карбодии-мидного связывания к поликарбоксилированным тиакаликсаренам ТКА совместно с НК, играющим роль медиатора электронного переноса. С этой целью стеклоуглеродный электрод покрывали пленкой ТКА, обрабатывали смесью 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида и *N*-гидроксисукцинимида, и далее – аптамером и НК. Установлены рабочие условия иммобилизации, обеспечивающие устойчивый и воспроизводимый сигнал аптасенсора (время сшивки 20 мин., мольное отношение ТКА:НК 1:8). После иммобилизации на вольтамперограммах регистрировали обратимый пик окисления-восстановления НК, отвечающий обратимому переносу двух электронов (4).



Зависимость тока пика I_p от скорости сканирования потенциала v соответствует диффузионному контролю переноса заряда ($dI_p/dlgv = 0.38$), что позволяет предположить прыжковый механизм переноса электрона между окисленными и восстановленными группами НК в пределах поверхностного слоя (рис.4).

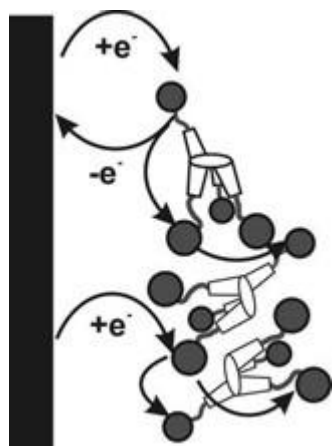


Рисунок 4 – Схематическое изображение внутри- и межмолекулярного электронного переноса, сопровождающего электродные реакции НК, ковалентно пришитого на макроциклических носителях

Значение тока пика восстановления на обратной ветви циклической вольтамперограммы несколько увеличивалось с pH раствора с максимумом при pH 7.8, а также при переходе от фосфатного к трис-буферному раствору, в котором проводили все последующие измерения. Расчет эффективной концентрации медиатора проводили по ур.(5) для скорости сканирования 50 мВ/с.

$$I_p = (n^2 F^2 v A \Gamma) / (4RT), \quad (5)$$

Эффективная поверхностная концентрация НК составила 22 ± 3 , 12 ± 4 и 17 ± 4 нанмоль/см² для ТКА конус, частичный конус и 1,3-альтернат, соответственно,

при номинальной концентрации ТКА 60 наномоль/см². Таким образом, пришив-ка НК оставляет достаточное количество свободных карбоксильных групп для ковалентного связывания аптамера.

В серии последовательных измерений из одного раствора установлено мо- нотонное снижение тока пика восстановления НК на 10-15%. Для его подавле- ния в раствор добавляли K₃[Fe(CN)₆], а стеклоуглеродный электрод дополни- тельно модифицировали слоем поли-НК, получаемым путем электрополимери- зации при сканировании потенциала от -800 до 800 мВ.

Морфологию поверхности электрода, модифицированного ТКА с кова- лентно связанными молекулами НК, изучали с помощью атомно-силовой микро- скопии (АСМ, рис.5).

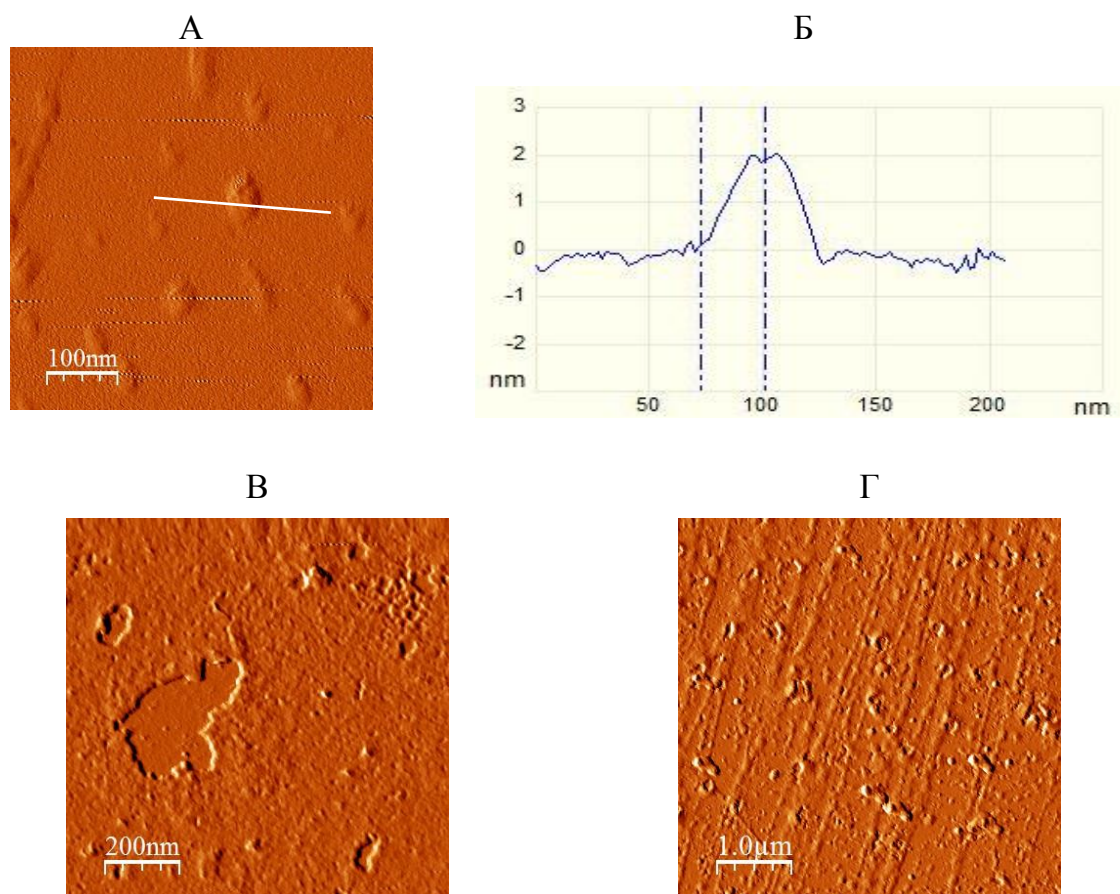


Рисунок 5 – Изображения АСМ пленки ТКА на высокоориентированном пиро- графите до (А, Б) и после (В, Е) пришивки НК. Концентрация ТКА 5 (А, В) и 50 (Г) наномоль/см²

В присутствии ТКА менее 5 наномоль/см² молекулы ТКА агрегируют в ча- стицы размером около 50 нм и высотой 6-8 нм, равномерно распределенные по полю носителя. Увеличение концентрации до 50 наномоль/см² приводит к обра-

зованию плотной пленки толщиной около 4 нм. Средний размер агрегатов увеличивается до 150-180 нм, их высота уменьшается до 4-6 нм. Обработка карбодиимидной смесью и НК приводит к увеличению рельефа пленки до 35-40 нм при средней толщине 4 нм. Полное заполнение поверхности достигается при концентрации макроцикла более 50 наномоль/см², что отвечает условиям электрохимического эксперимента.

Введение в раствор тромбина приводит к прогрессирующему уменьшению тока пика в результате разобщения переноса электрона в слое и уменьшения скорости регенерации окисленной формы НК на электроде (рис.6).

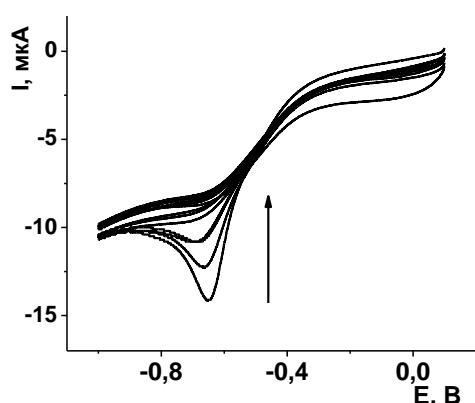
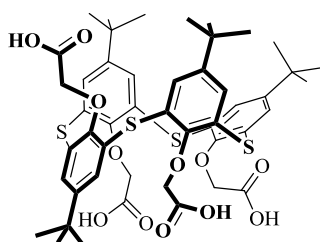


Рисунок 6 – Вольтамперграммы, полученные на аптасенсоре на тромбин на основе ТКА *частичный конус* с ковалентно пришитыми НК и аптамером на тромбин. Стрелка показывает изменение пика в присутствии 0-100 нМ тромбина.

Аптасенсор сохраняет работоспособность в течение, по крайней мере, двух недель. В процессе хранения разрешение пиков на вольтамперограммах ухудшается, однако относительное изменение тока пика в пределах погрешности измерения остается постоянным. Аналитические характеристики определения тромбина приведены в табл.3. Для сравнения приведены характеристики определения в присутствии тетраакислоты тиакаликс[4]арена (5) (прекурсор в синтезе ТКА), а также аптасенсоров с физически адсорбированным НК.



(5)

Установлено отсутствие мешающего влияния альбумина как модели сывороточных белков, а также возможность определения тромбина в синтетической плазме крови в физиологическом диапазоне его концентраций.

Импеданс аптасенсора на основе ТКА и НК показал бóльшую устойчивость отклика при многократном измерении из одного раствора. Лимитирующей стадией является перенос заряда на границе раздела электрод – раствор, при присоединении аптамера сопротивление R_{et} увеличивается незначительно, последую-

щая реакция с тромбином существенно снижает скорость переноса заряда. Характеристики импедиметрического определения тромбина приведены в табл.4.

Таблица 3. Аналитические характеристики определения тромбина с помощью вольтамперометрического аптасенсора на основе ТКА с ковалентно связанным НК, $\Delta I, \mu\text{кА}, = a + b \times \lg[\text{Тромбин}, \text{нМ}]$, $n=6$, $P<0.05$ *)

| Состав слоя | a | b | R ² | c _{lim} , нМ | ДОК, нМ |
|--|-----------|------------|----------------|-----------------------|----------|
| Адсорбция НК на ТКА, ковалентная пришивка аптамера | 0.03±0.01 | 0.016±0.02 | 0.9050 | 1.0 | 10 – 100 |
| ТКА, одновременная пришивка НК и аптамера | 0.99±0.03 | 0.49±0.04 | 0.9458 | 0.1 | 0.3–50 |
| ТКА, последовательная пришивка НК и аптамера | 1.04±0.02 | 0.53±0.05 | 0.9586 | 0.05 | 0.10–3.0 |
| Тетракислота (16), последовательная пришивка НК и аптамера | 0.39±0.98 | 0.13±0.01 | 0.9620 | 5.0 | 1 – 500 |
| Адсорбция аптамера на поли(НК) | 0.20±0.01 | 0.05±0.01 | 0.8983 | 5.0 | 10 – 100 |

*) c_{lim} – Предел обнаружения, ДОК – диапазон определяемых концентраций

Таблица 4. Аналитические характеристики определения тромбина с помощью импедиметрического аптасенсора на основе ТКА в различных конфигурациях с ковалентно пришитым НК и аптамером на тромбин, $n = 6$, $P<0.05$

| Конфигурация ТКА | R,% = a + b×lgc, нМ | | | c _{lim} , нМ |
|------------------------|---------------------|----------|----------------|-----------------------|
| | a | b | R ² | |
| <i>Конус</i> | 97.1±2.5 | 14.3±1.2 | 0.9332 | 0.5 |
| <i>Частичный конус</i> | 134.7±2.7 | 13.7±0.8 | 0.9334 | 0.3 |
| <i>1,3-Альтернат</i> | 92.4±3.9 | 74.3±5.1 | 0.9893 | 0.05 |
| C,% = a - b×lgc, нМ | | | | |
| <i>Конус</i> | 97.0±1.1 | 6.2±1.1 | 0.9145 | 4.0 |
| <i>Частичный конус</i> | 76.3±2.2 | 6.5±1.0 | 0.9055 | 8.0 |
| <i>1,3-Альтернат</i> | 77.3±3.4 | 10.2±1.8 | 0.8451 | 1.0 |

Сопротивление переноса заряда в наибольшей степени зависело от концентрации тромбина, увеличиваясь в пределах изученного интервала концентраций тромбина почти на 400%. Емкость менялась в меньшей степени, что подтверждает преобладающее влияние на сигнал диффузионного фактора, а не электро-

статических взаимодействий в пределах слоя. Относительная чувствительность сигнала при использовании различных конфигураций ТКА для импедиметрического и вольтамперометрического эксперимента не совпадает. В случае измерения импеданса наибольший наклон градуировочной зависимости наблюдается для *1,3-альтерната* (минимальный предел обнаружения 0.05 нМ), тогда как вольтамперометрический эксперимент показал наибольший наклон для *конуса* и *частичного конуса* (10-11 % изменения R_{et} на декаду).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОХРАТОКСИНА А И АУТОИММУННЫХ АНТИТЕЛ К ДНК

Охратоксин А – вторичный метаболит, продуцируемый грибами рода *Aspergillus* и *Penicillium*, – способен накапливаться в продуктах питания, оказывая нефротоксичное, тератогенное, канцерогенное, гепатотоксическое и иммунотоксическое действие на человека.

Для определения охратоксина А использовали аптамер 5'-GAT CGG GTG TGG GTG GCG TAA AGG GAG CAT CGG ACA TTT TTT TTT TTT-3'-NH₂, который иммобилизовали в условиях, ранее выбранных при конструировании аптасенсора на тромбин. Уменьшение сигнала аптасенсора при связывании микотоксина обусловлено переходом аптамера из линейной формы в G₄ квадруплекс, что сопровождается уплотнением слоя и нарушением обменных процессов между группами НК на макроциклическом носителе. Аналитические характеристики определения обоих микотоксинов представлены в табл.5.

Таблица 5. Вольтамперометрическое определение охратоксина А и охратоксина Б с помощью вольтамперометрического аптасенсора на основе ТКА *частичный конус* с ковалентно пришитым НК, n =6, P<0.05

| Аналит | I, мкА = a - b×lgc, нМ | | | ГОС, нМ | c _{lim} , нМ |
|--------------|------------------------|-----------|----------------|----------|-----------------------|
| | a | b | R ² | | |
| Охратоксин А | 0.56±0.04 | 0.47±0.03 | 0.9553 | 0.1-5.0 | 0.05 |
| Охратоксин Б | 0.18±0.02 | 0.22±0.04 | 0.9294 | 1.0-10.0 | 0.5 |

Селективность определения контролировали по охратоксину Б, продукту дехлорирования охратоксина А. По пределу обнаружения чувствительность разработанного аптасенсора превосходит или сопоставима с характеристиками большинства описанных электрохимических аптасенсоров, при этом измерение не требует дополнительных стадий отмывки, разделения или концентрирования

пробы. Достигнутый предел обнаружения также ниже установленного в отечественной методике хроматографического определения охратоксина А в продовольственном сырье и пищевых продуктах.

Аутоиммунные антитела к ДНК выделяются в случае ряда заболеваний, связанных с иммунологическими, генетическими, вирусными, лекарственными и гормональными факторами или их комбинациями. Обнаружение аутоиммунных антител к ДНК является важным вспомогательным диагностическим критерием, устанавливающим аутоиммунную природу заболевания. Для их обнаружения использовали ДНК-сенсор, включающий стеклоуглеродный электрод с нанесенным ТКА *частичный конус* с ковалентно связанным НК и физически адсорбированной нативной ДНК. Инкубирование в сыворотке крови больных аутоиммунным тиреоидитом вызывало прогрессирующее снижение сигнала в результате внедрения белка в поверхностный слой сенсора. Снижение прогрессировало с увеличением титра антител и уменьшалось с разбавлением сыворотки крови, тогда как при тестировании сыворотки здорового донора менялось незначительно (менее 15%), оставаясь практически постоянной при разведении более 1:20 - 1:5 (рис.7).

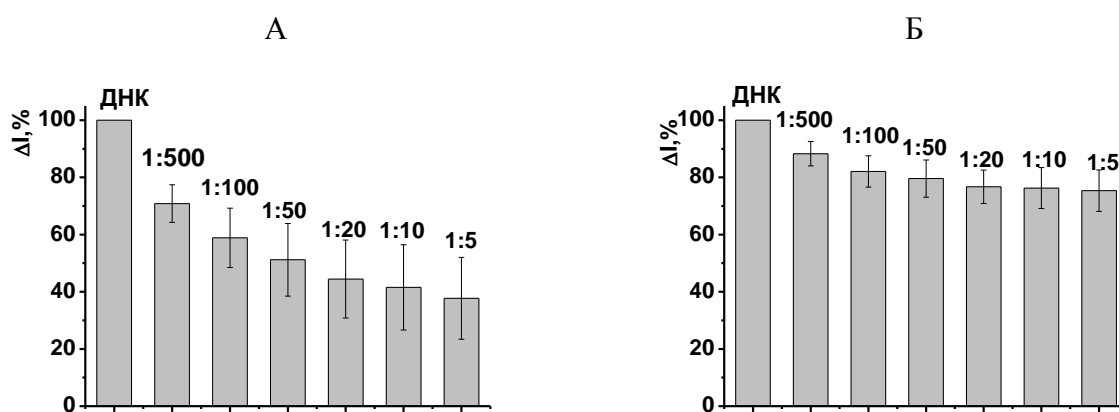


Рисунок 7 – Изменение тока пика восстановления НК при регистрации взаимодействий ДНК – аутоиммунные антитела при различном разведении сывороток крови больного аутоиммунного тиреоидита (А, титр 251) и здорового донора (Б).

Приведены результаты для 6 индивидуальных сенсоров, $P < 0.05$

Причиной подавления сигнала в отсутствие аутоиммунных антител может быть неспецифическая адсорбция сывороточных белков. Аналогичное изменение сигнала наблюдалось при инкубировании ДНК-сенсора в растворе сывороточного альбумина человека. При отмывке ДНК-сенсора после измерения ток

пика НК восстанавливается до 90% исходного значения в отсутствие аутоиммунных антител и практически не меняется после контакта с сывороткой крови больного. Критерием присутствия аутоиммунных антител можно считать снижение тока пика не менее чем на 30% при разбавлении сыворотки 1:50 – 1:100. Наиболее воспроизводимый сигнал и максимальное различие регистрируемого тока от холостого опыта достигаются при измерении в ГЕПЕС- или фосфатном буферном растворе при pH 7.0-7.5. Указанные условия согласуются с условиями устойчивости комплекса ДНК-антитело, установленными независимыми методами.

Импедиметрические измерения показали закономерное уменьшение сопротивления переноса заряда с минимумом в области разбавлений сыворотки около 1:5, что связано с экранированием отрицательного заряда ДНК в пределах слоя. Основное изменение R_{et} и C происходит на границе поверхностного слоя и анализируемого раствора. На внутренней границе электрод – биочувствительный слой сопротивление переноса заряда при взаимодействии ДНК с антителами менялось не более чем на 5%. Сыворотки крови здоровых доноров в указанных условиях не меняли сопротивления переноса заряда либо незначительно его увеличивали в результате адсорбции сывороточных белков (рис.8).

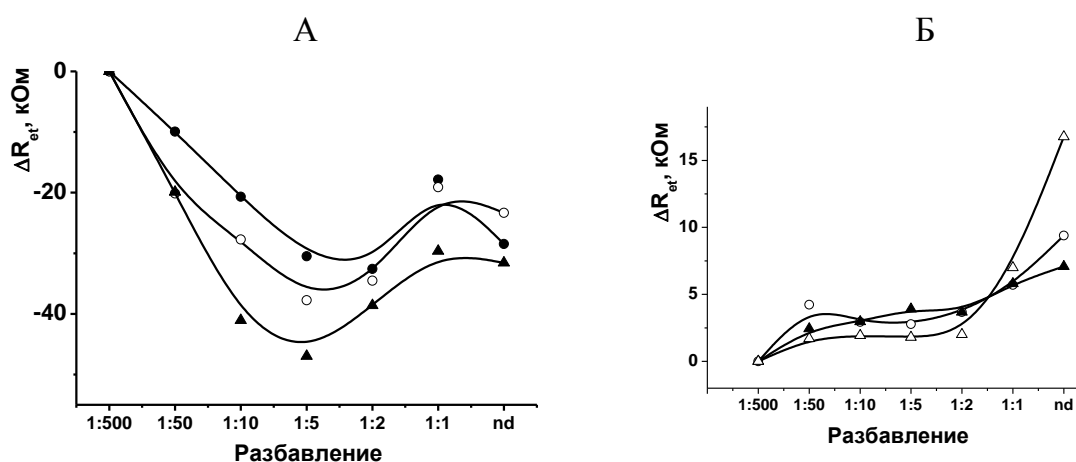


Рисунок 30 - Изменение R_{et} ДНК-сенсора на основе ТКА с ковалентно связанным НК при разбавлении сыворотки крови больного аутоиммунным тиреоидитом (А, титр 450) и здорового донора (Б). Приведены кривые разбавления для трех сенсоров, nd – неразбавленная сыворотка

Наилучшие характеристики воспроизводимости импедиметрического отклика наблюдались для сывороток непосредственно после их размораживания при расчете изменения параметров относительно максимального разбавления

пробы 1:500. Хранение размороженных сывороток при 4°C увеличивает разброс значений сопротивления R_{et} , особенно в области малых разбавлений. То же, хотя и в меньшей степени, наблюдается и для сыворотки крови здоровых доноров.

Положение минимума на кривой зависимости ΔR_{et} – разбавление сыворотки слабо зависит от титра. Подавление влияния антител в области малых разбавлений можно объяснить как мешающим влиянием неспецифически связывающихся сывороточных белков, так и нарушением прочности связывания антител при превышении их оптимального соотношения к антигену, присутствующему в растворе. Применительно к аутоиммунным антителам к ДНК аналогичный эффект был обнаружен ранее при иммуноферментной регистрации с амперометрическим преобразователем сигнала.

Анализ полученных зависимостей для более чем 10 сывороток крови больных аутоиммунным тиреоидитом показал, что в качестве диагностического критерия целесообразно использовать различие в значении сопротивления переноса заряда 15-20 кОм при разбавлении 1:5 и 1:500. Это почти в 8 раз больше, чем аналогичный показатель для крови здоровых доноров. Качественным критерием присутствия аутоиммунных антител в сыворотке крови может быть форма кривой разбавления с минимумом в области средних разбавлений и общим снижением сопротивления переноса заряда относительно холостого опыта.

Разработанные ДНК-сенсоры с вольтамперометрической и импедиметрической регистрацией сигнала можно использовать как вспомогательное средство диагностики для подтверждения аутоиммунного характера заболевания щитовидной железы.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны ДНК-сенсоры на основе наноразмерных медиаторов электронного переноса (Нейтральный Красный) на макроциклических поликарбоксилированных носителях и полиэлектролитных комплексов ДНК с включением продуктов электрополимеризации фенотиазиновых красителей (Метиленовый синий, Метиленовый зеленый), поли(аллиламин гидрохлорида) и полистиролсульфоната для регистрации специфических взаимодействий с участием ДНК (определение аутоиммунных антител и окислительного повреждения ДНК) и аптамеров на тромбин и охратоксин А.
2. Включение нативной ДНК в состав полиэлектролитных комплексов, получаемых путем самосборки на электрополимеризованных покрытиях полифенотиазиновых красителей, позволяет регистрировать повреждение ДНК по характерным изменениям сопротивления переноса заряда и емкости слоя, связанных с нарушением регулярности строения ДНК, и как следствие – изменением распределения зарядов в пределах полислоистого покрытия.
3. Вольтамперометрический отклик поликарбоксилированных тиакаликс[4]аренов, модифицированных Нейтральным красным, определяется межмолекулярным электронным обменом с участием феназиновых фрагментов модификатора. Включение в состав слоя молекул аналитов тормозит перенос электрона и вызывает уменьшение регистрируемого тока пика восстановления. Для улучшения характеристик сенсоров предложена дополнительная модификация электрода поли(Нейтральным Красным).
4. Изменение конфигурации поликарбоксилированных тиакаликсаренов влияет на эффективность их ковалентной модификации медиатором и аптамером и на чувствительность и селективность сигнала. При регистрации взаимодействия аптамер – тромбин наилучшие характеристики достигнуты при использовании *1,3-альтерната*. Разработанные аптасенсоры позволяют проводить определение до 0.05 нМ тромбина (вольтамперометрическая и импедиметрическая регистрация сигнала) и 0.3 нМ охратоксина А (вольтамперометрические биосенсоры) при минимальном влиянии матричных компонентов (сывороточные белки).
5. ДНК-сенсоры на основе разработанных наноразмерных медиаторов с Нейтральным красным в качестве медиатора электронного переноса и нативной ДНК позволяют качественно определять присутствие в сыворотке крови больных аутоиммунными заболеваниями присутствие антител к ДНК. Предложены вольтамперометрические и импедиметрические способы регистрации антител по изменению тока пика восстановления медиатора в вольтамперометрическом варианте и величине и характеру изменения сопротивления переноса заряда при различных разбавлениях сыворотки – для импедиметрического биосенсора.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Порфирьева, А.В. Биосенсоры на основе полиэлектролитных комплексов ДНК и электрополимеризованных материалов / А.В.Порфирьева, **В.Б.Костылева (Степанова)**, А.И.Замалеева, Г.А.Евтюгин, Р.Ф.Фахруллин, В.З.Латыпова // Уч.записки Казанского ун-та. Сер.естеств.наук.- 2010.- Т.152, №3.- С.123-133.
2. Evtugyn, G. Electrochemical aptasensor based on a macrocyclic ligand bearing Neutral Red / G.Evtugyn, **V.Kostyleva (Степанова)**, R.Sitdikov, A.Porfireva, M.Savelieva, I.Stoikov, I.Antipin, T.Hianik // Electroanalysis - 2012.- V.24, №1.- P.91-100.
3. Evtugyn, G.A. Label-free aptasensor for thrombin determination based on the nanostructured phenazine mediator / G.A.Evtugyn, **V.B.Kostyleva (Степанова)**, A.V.Porfireva, M.A.Savelieva, V.G.Evtugyn, R.R.Sitdikov, I.I.Stoikov, I.S.Antipin, T.Hianik // Talanta- 2012.- V.102.- P.156-163.
4. **Костылева (Степанова), В.Б.** Импедиметрические биосенсоры на основе полиэлектролитных комплексов ДНК для контроля загрязнения окружающей среды / В.Б.Костылева, А.В.Порфирьева, Г.А.Евтюгин, В.З.Латыпова // «Аналитическая химия - новые методы и возможности» Съезд аналитиков России и Школа молодых ученых. 26-30 апреля 2010 г.- С.159-160.
5. Evtugyn, G.A. Amplification of the signal of electrochemical (bio)sensors by implementation of nanosized mediator systems into self-assembled polyelectrolyte surface layers / G.A.Evtugyn, **V.B.Kostyleva (Степанова)**, A.V.Porfireva, U.Ju. Tcherkina, T.Hianik // "Matrafured'11" International Conference on Electrochemical Sensors. Budapest - Dobogeko, 19.06.2011-24.06.2011. Budapest, 2011.- P.35.
6. Порфирьева, А.В. Импедиметрический ДНК-сенсор на основе углеродных нанотрубок и фенотиазиновых красителей / А.В.Порфирьева, **В.Б.Костылева (Степанова)**, У.Ю.Черкина // IX Научная конференция молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра Казанского государственного университета «Материалы и технологии XXI века», Казань, 7-8 декабря 2009 г.
7. Evtugyn, G.A. Electrochemical aptasensors based on polycarboxylated support bearing Neutral Red mediator for thrombin and ochratoxin A determination / G.A.Evtugyn, **V.B.Kostyleva (Степанова)**, A.V.Porfireva, M.A.Savelieva, T.Hianik // 5th International Symposium on "Biosensors for food safety and environmental monitoring" Ourzazate - Morocco Oct. 6-8, 2011. Book of Abstracts, 2011.- P.33

8. Савельева, М.А. Электрохимические ДНК-сенсоры на основе электрополимеризованных материалов и полиэлектролитных комплексов / М.А. Савельева, **В.Б. Костылева (Степанова)** // Труды XIII Всероссийской научно-практической конференции имени профессора Л.П.Кулева студентов и молодых ученых с международным участием «Химия и химическая технология в XXI веке». Томск, Томский политехнический университет, 14-17 мая 2012 г.- 2012.- Т.1.- С.281-282.
9. **Костылева (Степанова), В.Б.** Электрохимические аптасенсоры на основе новых макроциклических медиаторных систем / В.Б.Костылева, А.В.Порфирьева, М.А.Савельева, Т.Хианик, Г.А.Евтюгин //VIII Всероссийская конференция по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2012»: Материалы конф. Уфа-Абзаково, 3-9 июня 2012 г. / Отв. ред. В.Н. Майстренко., Уфа: РИЦ БашГУ, 2012. - с.36.

