

На правах рукописи

ПОРФИРЬЕВА АННА ВЕНИАМИНОВНА

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ДНК-СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ
ЭЛЕКТРОПОЛИМЕРИЗОВАННЫХ МАТЕРИАЛОВ**

02.00.02 – Аналитическая химия

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань - 2008

Работа выполнена на кафедре аналитической химии Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования "Казанский государственный университет им.В.И.Ульянова-Ленина"

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор

Евтюгин Геннадий Артурович

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор

Гармонов Сергей Юрьевич

доктор химических наук, профессор

Бабкина Софья Сауловна

Ведущая организация: Уральский государственный экономический университет (г.Екатеринбург)

Защита диссертации состоится 19 июня 2008 г. в 14³⁰ на заседании диссертационного совета Д 212.081.03 при Казанском государственном университете по адресу: г.Казань, ул.Кремлевская, 18, Химический институт им.А.М.Бутлерова, Бутлеровская аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им.Н.И.Лобачевского Казанского государственного университета

Отзывы на автореферат просим присылать по адресу: 420008, г.Казань, ул. Кремлевская, 18, КГУ, Отдел аттестации научных кадров.

Автореферат разослан " ____ " _____ 2008 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат химических наук



М.А.Казымова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Одним из актуальных направлений развития современной биоаналитической химии является создание ДНК-сенсоров, предназначенных для определения комплементарных нуклеотидных последовательностей, а также специфических белков и низкомолекулярных соединений биологического значения. Благодаря высокой концентрации заряда и значительному числу активных функциональных групп нуклеиновые кислоты обеспечивают многоточечное нековалентное связывание широкого круга определяемых соединений. В последние годы большое внимание привлекают электрополимеризуемые материалы, получаемые *in situ* непосредственно на поверхности преобразователя сигнала. К их достоинствам относятся простота получения, контроль состава и характеристик непосредственно на стадии синтеза, высокая адгезия к материалу электрода и возможность модификации параметров, таких как заряд и электрохимическая активность, в зависимости от назначения и природы биологического компонента в составе биосенсора. Несмотря на быстрое развитие данного направления, применительно к ДНК-сенсорам примеров использования электрополимеризованных материалов относительно немного. Вышесказанное определяет *актуальность исследования*, направленного на наиболее полную реализацию преимуществ, создаваемых электрополимеризованными материалами в составе ДНК-сенсоров при иммобилизации и получении аналитического сигнала в отношении высоко- и низкомолекулярных соединений.

Целью данной работы явилось создание электрохимических ДНК-сенсоров, предназначенных для решения задач клинической диагностики, в основе которых лежит взаимодействие ДНК с полиэлектролитными электрохимически активными материалами, получаемыми путем электрополимеризации.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить *следующие задачи*:

- изучить условия электрополимеризации фенотиазиновых красителей и анилина на поверхности золотых и стеклоуглеродных электродов в зависимости от назначения ДНК-сенсора и способа генерирования аналитического сигнала;
- разработать новые способы нанесения биологических компонентов - ДНК-зондов, нативной и денатурированной ДНК и аптамеров на α -тромбин - поверх электрополимеризованных материалов с учетом требований чувствительности регистрации взаимодействий с определяемыми соединениями и формата измерения аналитического сигнала;
- изучить возможности регистрации гибридизации комплементарных ДНК-зонду олигонуклеотидных последовательностей на поверхности сенсоров, модифициро-

ванных сополимером тирамина и *o*-аминофенола, с помощью диффузионно свободных маркеров;

- провести сравнительную характеристику пьезометрического и потенциометрического определения α -тромбина с помощью аптасенсоров на основе комплексов аптамеров с электрополимеризованными анилином, метиленовым синим и метиленовым зеленым;
- разработать новый способ обнаружения аутоиммунных антител к ДНК в сыворотке крови больных аутоиммунными заболеваниями с помощью потенциометрических сенсоров на основе полиэлектролитных комплексов ДНК с электрополимеризованными материалами и изучить механизм формирования сигнала с привлечением данных импедиметрических исследований переноса заряда на границе модифицирующий слой - электрод.

Научная новизна работы заключается в том, что:

- обосновано использование в составе ДНК-сенсоров продуктов электрополимеризации фенотиазиновых красителей (метиленового синего и метиленового зеленого) и анилина, обеспечивающих улучшенные характеристики иммобилизации и аналитического сигнала для пьезометрического и потенциометрического определения взаимодействия ДНК (аптамер) - белок;
- показана возможность использования ДНК-сенсора на основе планарных золотых электродов, модифицированных сополимером тирамина и *o*-аминофенола, для регистрации комплементарных олигонуклеотидных последовательностей по сигналу диффузионно свободных маркеров.
- предложены и реализованы на примере определения α -тромбина и аутоиммунных антител к ДНК различной этиологии новые способы регистрации взаимодействий ДНК-белок, основанные на измерении потенциала ДНК-сенсора до и после его контакта с определяемыми компонентами;
- обоснован механизм формирования сигнала потенциометрического ДНК-сенсора на основе полиэлектролитных комплексов ДНК - полианилин (полифенотиазин), связанный с изменением редокс-активности и допирующей способности полимеров в зависимости от pH и присутствия специфически связывающегося белка в составе поверхностного слоя;
- разработаны пьезометрические сенсоры для определения α -тромбина с улучшенными характеристиками связывания и чувствительности определения, достигнутыми за счет использования электрополимеризованных полифенотиазинов в качестве матрицы биологических компонентов.

Практическая значимость работы состоит в том, что:

- предложены простые и удобные в использовании способы модификации золотых и стеклоуглеродных электродов полиэлектролитными комплексами ДНК (аптамер) - полианилин (полифенотиазиновый краситель), обеспечивающие возможность регистрации специфических взаимодействий с участием ДНК и высокочувствительного определения биологических компонентов диагностического значения;
- разработаны методики тестирования сывороток крови для установления присутствия в них аутоиммунных антител к ДНК, предложены диагностические критерии сигнала ДНК-сенсоров для больных аутоиммунным тиреоидитом и системной красной волчанкой;
- предложен новый формат изготовления пленочных золотых одноразовых сенсоров на основе пластин компакт-диска для записи и разборная ячейка для их использования.

На защиту выносятся:

- результаты изучения электрохимического поведения фенотиазиновых красителей и анилина на различных электродах и выводы о влиянии условий электрополимеризации на генерирование аналитического сигнала и возможность регистрации гибридации комплементарных олигонуклеотидных последовательностей и специфических взаимодействий ДНК - белок (аптамер - белок);
- оценка влияния природы маркеров на сигнал ДНК-сенсора на основе планарных золотых электродов, модифицированных ДНК-зондами и сополимером тирамина и *o*-аминофенола и вывод о возможности регистрации взаимодействий с участием ДНК и олигонуклеотидов по электрохимическим характеристикам маркеров;
- результаты пьезометрического и импедиметрического изучения аптасенсоров на основе электродов, модифицированных полифенотиазинами или полианилином и аптамером на α -тромбин и выводы о влиянии природы матрицы на чувствительность определения α -тромбина и селективность сигнала в присутствии сывороточного альбумина человека;
- новый способ регистрации аффинных взаимодействий ДНК (аптамер) - белок по изменению потенциала стеклоуглеродного электрода, модифицированного полиэлектролитным комплексом ДНК - полимер, до и после его контакта с белком, измеренного при различных рН и выводы о возможном механизме формирования сигнала для различных электрополимеризованных материалов.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на 17 Международном симпозиуме по биоэлектрохимии и биоэнергетике (Флоренция, 2003), Международном симпозиуме "Новые тенденции развития биосенсоров на основе нуклеиновых кислот" (Флоренция, 2003), Всероссийской конференции с международным

участием "Электроаналитика-2005" (Екатеринбург, 2005), V научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века" (Казань, 2005), Итоговой научной конференции Казанского государственного университета (Казань, 2005); Международной конференции "Химия, химическая технология и биотехнология" (Томск, 2006), Международном конгрессе по аналитической химии ICAS-2006 (Москва, 2006), VI Республиканской школе студентов и аспирантов "Жить в XXI веке" (Казань, 2006), XVIII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Москва, 2007), II Всероссийской конференции с международным участием "Аналитика России" (Краснодар - Туапсе, 2007), III Международном симпозиуме "Биосенсоры в обеспечении пищевой безопасности и экологическом мониторинге" (Фес, 2007).

Диссертация выполнена на кафедре аналитической химии Казанского государственного университета при поддержке РФФИ (грант № 06-03-32217 "Электрохимические ДНК-сенсоры с ферментативным усилением сигнала"), научно-образовательной программы CRDF и Минобрнауки РФ (НОЦ КГУ "Материалы и технологии XXI века", REC-007). Исследования в области создания пьезометрических сенсоров на α -тромбин проводили на кафедре ядерной физики и биофизики университета Комениуса (Братислава, Словакия). В работе использовали оборудование Федерального центра коллективного пользования уникальным научным оборудованием Казанского государственного университета.

Основные результаты изложены в 3 статьях и 10 тезисах докладов. Получено положительное решение по заявке на патент РФ.

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 ДНК-сенсоров и изучении их характеристик, интерпретации, анализе и систематизации полученных результатов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 166 страницах машинописного текста, включает 69 рисунков и 8 таблиц.

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 основные направления создания электрохимических ДНК-сенсоров для определения высоко- и низкомолекулярных соединений, а также обобщены результаты использования электрохимически полимеризованных материалов в составе биосенсоров.

В *Экспериментальной части* (глава 2) представлены данные об объектах исследования, используемых методах и измерительном оборудовании, приведены условия эксперимента.

Главы 3-5 посвящены обсуждению полученных результатов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Экспериментальная часть

Использовали ДНК из эритроцитов цыплят ("Reanal", Венгрия), олигонуклеотиды, предоставленные НПВП "Литех" и аптамеры, синтезированные Thermo Electron Corporation (Германия) и предоставленные для исследования проф.Т.Хиаником (Университет Комениуса, Братислава, Словакия). Сыворотки крови человека (больных аутоиммунным тиреоидитом, системной красной волчанкой и здоровых доноров), а также сыворотки крови здоровых и иммунизированных кроликов были предоставлены кафедрой эндокринологии Казанской государственной медицинской академии (зав.каф., проф. Л.И.Анчикова). Электрополимеризацию анилина и фенотиазиновых красителей проводили в режиме многократного циклирования потенциала соответственно из сильных минеральных кислот и фосфатного или трис-буферного растворов.

В качестве рабочих электродов для изготовления сенсоров использовали золотые пленочные электроды (0.07 см^2) из компакт-дисков (CD-троды, разборная ячейка для работы с электродами приведена на рис.1), пьезосенсоры с золотыми возбуждающими электродами, а также стеклоуглеродные электроды (0.0176 см^2) СУ2500 (НИИ Графит, г. Москва), впрессованные в тефлоновый корпус.

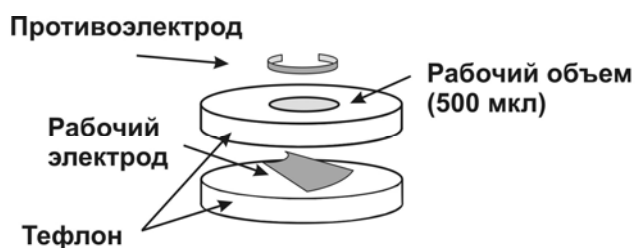


Рисунок 1 - Конструкция разборной ячейки для работы с планарными золотыми тонкопленочными электродами (CD-троды)

Вольтамперометрические измерения проводили в нетермостатированной трехэлектродной ячейке с платиновым противозлектродом и хлоридсеребряным электродом сравнения с помощью вольтамперографов BAS CV-50W (BAS Inc., США), Эко-тест-ВА ("Эконикс-Эксперт", Москва) AUTOLAB PGSTAT 302 и μ AUTOLAB (Eco-Chemie, Голландия), пьезометрические измерения - с помощью электрохимического пьезоанализатора CHI-410 (CH Instruments Inc., США) с пьезокварцевым резонатором на основе АТ-среза кристалла кварца ($f_0 = 8 \text{ МГц}$) с золотыми возбуждающими электродами (0.28 см^2), импедиметрические - с помощью модуля FRA2 (AUTOLAB PGSTAT 302).

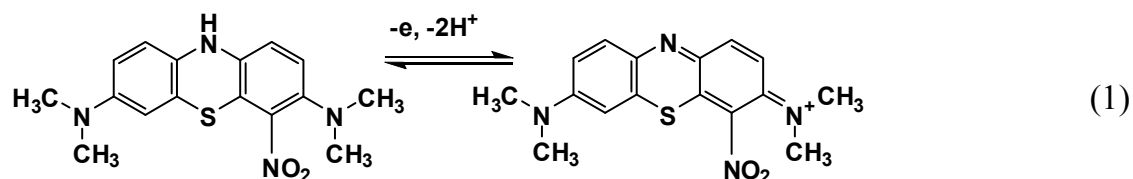
Общая характеристика разработанных биосенсоров, приведена в табл.1 (ПАНИ - полианилин, поли(МС) и поли(МЗ) - полимерные формы метиленового синего и метиленового зеленого, соответственно). Иммунизацию ДНК, олигонуклеотидов и аптамеров проводили методами электростатической адсорбции с последующей кросс-сшивкой глутаровым альдегидом или авидин-биотинового связывания поверх слоя электрополимеризованного материала.

Таблица 1. ДНК-сенсоры на основе электрополимеризованных материалов

Преобразователь	Способ регистрации	Модификатор	Биокомпонент	Назначение
СД-трод	Вольтамперометрический	Сополимер тирамина и <i>o</i> -аминофенола	ДНК, олигонуклеотиды	Определение гибридизации олигонуклеотидов
Стеклоуглерод	Потенциометрический	ПАНИ, поли(МЗ), поли(МС)	ДНК	Определение аутоиммунных антител к ДНК
Стеклоуглерод	Потенциометрический, импедиметрический	поли(МЗ), поли(МС), ПАНИ	Аптамеры	Определение тромбина
Пьезокварцевый резонатор	Пьезометрический	поли(МЗ), поли(МС)	Аптамеры	Определение тромбина

ДНК-сенсоры на основе золотых электродов, модифицированных сополимером тирамина и *o*-аминофенола

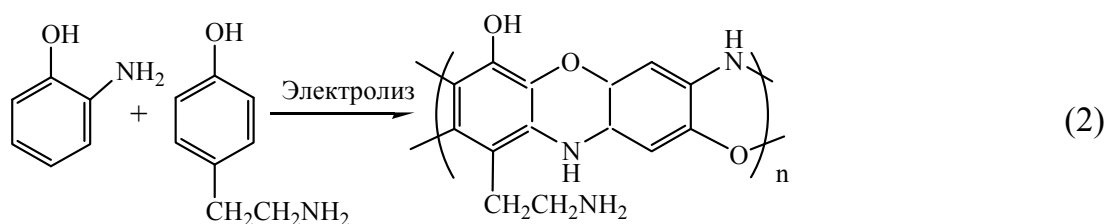
Предварительно было изучено электрохимическое поведение метиленового зеленого (МЗ) на золотых микродисковых электродах. Было показано, что обратимое окисление маркера (1) осложнено адсорбцией и ускоряется в присутствии ДНК и олигонуклеотидов за счет адсорбционного накопления деполаризатора.



Предложены протоколы измерения сигнала в режиме квадратно-волновой вольтамперометрии и количественные характеристики влияния олигонуклеотидов.

Чтобы оценить возможность регистрации гибридационных взаимодействий по сигналу МЗ, электрод, модифицированный TGTAAGCCCCGCATTGCTC (ДНК-зонд), инкубировали в растворе комплементарного олигонуклеотида GAGCAATGCGGGGCTTTACA. При этом сигнал маркера снижался на 15-20% вследствие частичного экранирования заряда фосфатного остова ДНК-зонда и увеличения толщины поверхностного слоя в результате встраивания в него комплементарного олигонуклеотида. Предел обнаружения составил 2 наномоль при количестве ДНК-зонда на электроде 0.2 наномоль. Некомплементарный олигонуклеотид dT₂₀ влияет на ток окисления МЗ незначительно.

Чтобы повысить поверхностную концентрацию ДНК-зонда, впервые предложено использовать для иммобилизации сополимер тирамина и *o*-аминофенола, наносимый на пленочные золотые электроды, изготовленные из компакт-дисков для перезаписи (CD-RW). Электроды закрепляли в разборной ячейке из политетрафторэтилена (рис.1), в качестве уплотнительной мембраны использовали пленку Parafilm и политетрафторэтилен. Продукт полимеризации, проводимой при сканировании потенциала, предположительно имеет строение (2).



В отличие от ранее описанного политирамина сополимер (2) не пассивирует электрод и позволяет проводить измерения токов маркера после присоединения ДНК-зонда кросс-сшивкой глутаровым альдегидом. В модельных экспериментах с нативной ДНК вместо ДНК-зонда на поверхности сенсора в серии многократных измерений из одного раствора наблюдается увеличение сигнала МЗ за счет электростатического накопления деполяризатора. Аналогичные изменения наблюдались при использовании в качестве маркера гидрохинона. Инкубирование сенсора, включающего ДНК-зонд, приводит к некоторому уменьшению сигнала. Разнонаправленное изменение сигнала гидрохинона в присутствии на поверхности одно- и двуниевых олигонуклеотидов позволяет использовать сенсор для регистрации гибридизации (обнаружения олигонуклеотидов, комплементарных ДНК-зонду). В качестве примера на рис.2 представлена концентрационная зависимость сигнала, полученная с гидрохиноном.

Изменение сигнала маркеров в серии последовательных измерений из одного раствора обусловлено, по-видимому, разным характером накопления электрохимически активных компонентов в поверхностном слое биосенсора.

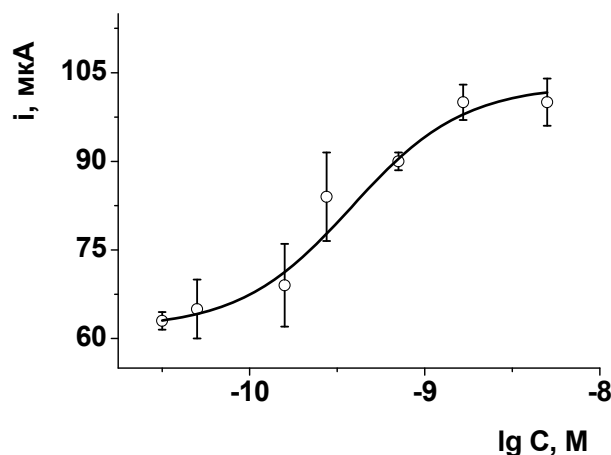


Рисунок 2 - Зависимость тока окисления гидрохинона от концентрации комплементарного ДНК-зонду олигонуклеотида М-1. Гидрохинон 6.0 мМ

Аптасенсоры для определения α -тромбина на основе электрополимеризованных материалов

α -Тромбин является удобной моделью для разработки новых принципов измерения сигнала аптасенсоров, а также имеет значение для контроля коагуляции крови и тромбообразования, в том числе, в хирургической практике. Эффективность связывания аптамера с тромбином во многом определяется условиями иммобилизации аптамера на поверхности сенсора. Для изучения связывания сначала было проведено исследование взаимодействия аптамера и тромбина на полимерных материалах, получаемых на основе фенотиазиновых красителей и анилина.

Аптасенсоры на основе полимерных форм фенотиазиновых красителей. Полимеризацию МЗ и МС проводили путем циклирования потенциала из их слабощелочных растворов. Наиболее стабильная пленка и воспроизводимые параметры сигнала аптасенсоров на ее основе были получены для десяти циклов полимеризации. Пьезометрическая оценка поверхностной концентрации продукта полимеризации МС - поли(МС) - дала удельное количество полимера (7.2 ± 1.4), для МЗ - (0.11 ± 0.07) наномоль см^{-2} . МЗ дает, по-видимому, эквимольный комплекс окисленной и восстановленной форм красителя, далее называемый также поли(МЗ). Для последующей иммобилизации 3'-биотинированного аптамера, специфически связывающего тромбин, 5'-GGTTGGTGTGGTTGGTTTTTTTTTTTTTTT-3' электрод сначала модифицировали авидином, осаждаемым из раствора при циклировании потенциала. По сравнению с электростатической адсорбцией при постоянном анодном потенциале данный способ существенно сокращает продолжительность процедуры. После иммобилизации авидина электрод инкубировали в растворе аптамера. Полученный аптасен-

сор инкубировали в растворах α -тромбина и сывороточного альбумина человека (HSA). Типичные концентрационные зависимости приведены на рис.3.

В табл.2 приведены сравнительные аналитические характеристики определения α -тромбина на полимерных матрицах и на золотом электроде, модифицированном авидином и его тиолированным аналогом - ньютравидином.

По сравнению с авидином и ньютравидином, иммобилизованными на чистом золотом электроде, положительно заряженные полифенотиазиновые красители подавляют неспецифическую сорбцию белка.

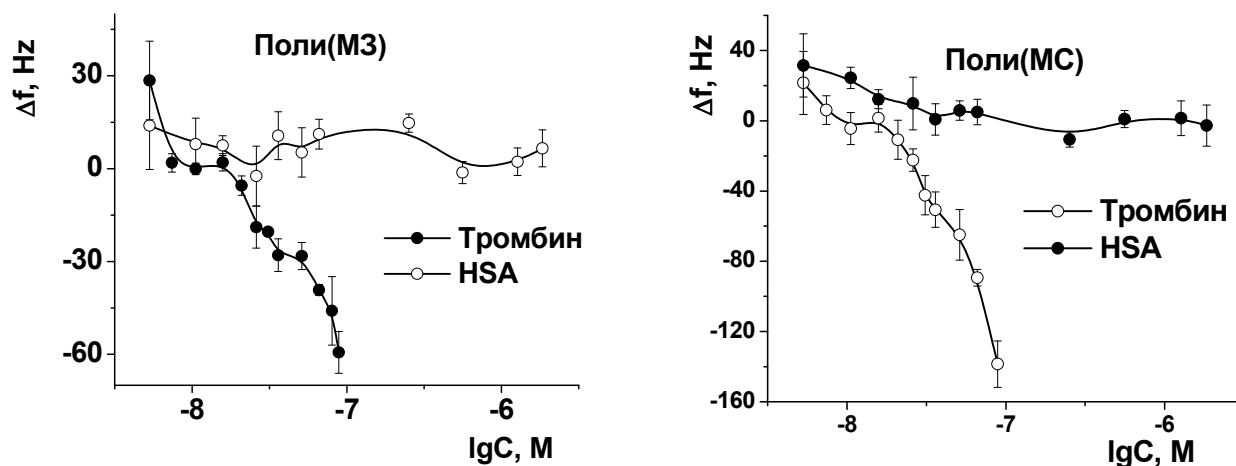


Рисунок 3 - Зависимости сигнала пьезокварцевых аптасенсоров от концентрации α -тромбина и сывороточного альбумина человека (HSA)

Таблица 2. Определение α -тромбина с помощью аптасенсоров на основе пьезокварцевых резонаторов с различными модифицирующими покрытиями

Модификатор	$\Delta f, \text{Гц}, = a + b \times C, \text{нМ}$			
	a	- b	S	R
Поли(МЗ)+авидин	5.5 ± 1.7	0.80 ± 0.04	1.077	-0.9858
Поли(МС)+авидин	21.0 ± 4.0	1.70 ± 0.11	0.711	-0.9916
Поли(МЗ)+авидин+HSA	2.0 ± 1.2	0.71 ± 0.04	2.349	-0.9397
Поли(МС)+авидин+HSA	7.8 ± 6.4	1.50 ± 0.16	12.590	-0.9544
Авидин	14.5 ± 3.1	0.82 ± 0.09	0.313	-0.9956
Ньютравидин	14.3 ± 3.2	0.81 ± 0.09	0.308	-0.9962

Потенциометрические измерения тромбина проводили на стеклоглеродных электродах, покрытых электрополимеризованными фенотиазиновыми красителями. Кулонометрические измерения показали образование 35 наномоль поли(МЗ) и 75 наномоль поли(МС) в расчете на мономер на 1 см^2 поверхности стеклоглерода. Сигнал

сенсора обусловлен влиянием биоконпонентов на распределение рН вблизи поверхности сенсора и рН-зависимое равновесие окисления/восстановления модификатора. По сравнению с пьезосенсорами, потенциометрический сигнал более чувствителен к неспецифическим белкам. Максимальное смещение потенциала аптасенсора относительно контроля в изученном интервале концентраций HSA не превышало 7 мВ при погрешности измерения 5%.

Присутствие α -тромбина увеличивает сигнал за счет образования комплекса с аптамером. Максимальное изменение потенциала аптасенсора составило 26 мВ ($\pm 3.5\%$ для трех независимых измерений). Для подавления десорбции биоконпонентов поверхностного слоя процедуру иммобилизации изменили - на электрод наносили смесь авидина и HSA, в которую вносили глутаровый альдегид. Независимо от способа иммобилизации потенциометрический сигнал аптасенсора показал максимум в области связывания α -тромбина, установленной по результатам пьезокварцевого микровзвешивания. Предельные значения сигнала аптасенсора для двух способов иммобилизации практически совпадали.

Аптасенсор на основе ПАНИ. Полимеризацию анилина проводили в серной кислоте при десяти циклах сканирования потенциала, соответствующих осаждению 1.2 ± 0.2 мкмоль/см² полимера в расчете на мономерное звено. Измерение сигнала проводили, инкубируя аптасенсор в растворе тромбина при рН 7.6 (максимум связывания) и измеряя сигнал при рН 3.0 (область электрохимической активности полимера). Изменение сигнала потенциометрического аптасенсора оказалось незначительным в силу недостаточной прочности связывания тромбина в кислой среде. Результаты измерения для различных условий иммобилизации компонентов слоя приведены на рис. 4.

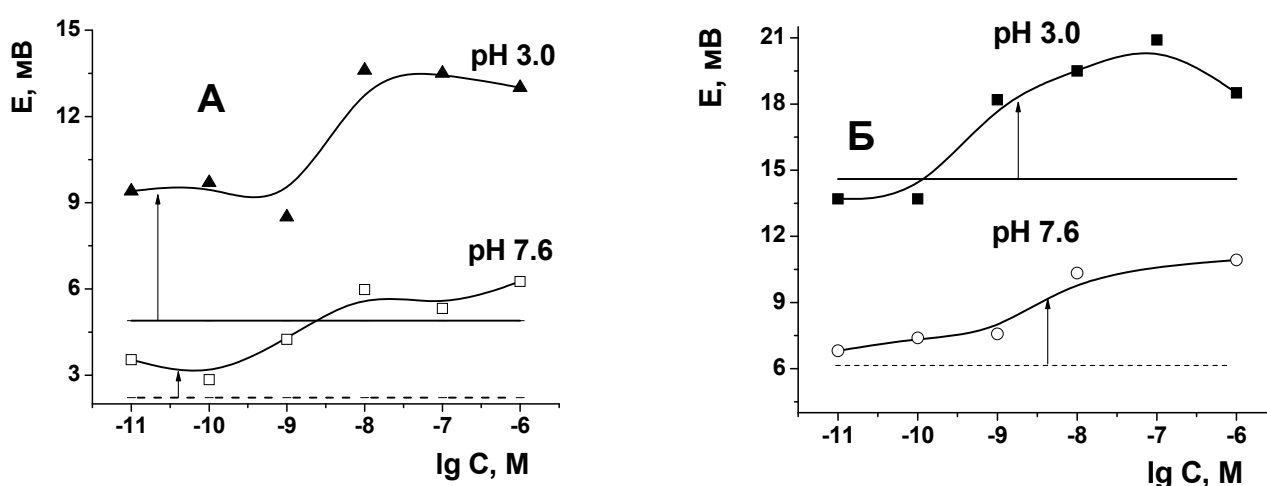
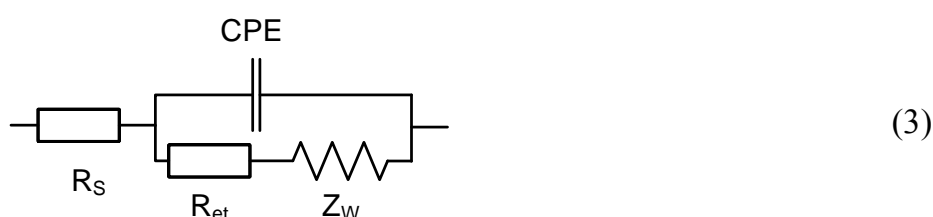


Рисунок 4 - Зависимость сигнала потенциометрического аптасенсора на основе ПАНИ и авидина, иммобилизованного путем электростатической сорбции (А) и в матрице альбумин - глутаровый альдегид (Б), от концентрации тромбина. Сплошная и пунктирная линии показывают изменение потенциала в контрольном измерении

Присутствие в поверхностном слое HSA, составляющего матрицу для иммобилизации авидина, приводит к синхронному смещению зависимости к большим значениям потенциала. При этом сохраняются как относительные вариации потенциала с концентрацией тромбина, так и положение максимума.

Измерение электрохимического импеданса модифицированных электродов проводили в присутствии эквимольной смеси $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Для расчета параметров импеданса использовали эквивалентную схему Рэнделса (Randles) (3), где R_s - сопротивление переноса заряда в растворе, R_{et} - сопротивление переноса заряда в полимерном слое, Z_w - сопротивление Варбурга, связанное с переносом ионов из раствора в полимерную пленку (обычно им пренебрегают), CPE - постояннофазовый элемент, приближающийся в данном случае к емкости поверхностного слоя.



Поскольку ПАНИ обладает собственной электропроводностью, модель Рэнделса не вполне точно описывает поведение сенсора, но позволяет оценить параметры импеданса для различных составов поверхностного слоя сенсора. В наибольшей степени присоединение тромбина влияет на сопротивление переноса заряда, описываемое для электростатической адсорбции авидина ур. (4). Погрешность измерения составила 10% для шести измерений, интервал концентраций тромбина 10^{-10} - 10^{-7} М.

$$\begin{aligned} \text{pH } 3.0: R_{et}, \text{ кОм}, &= 29.0 + 2.6 \times \lg[\text{Тромбин}] \\ \text{pH } 7.6: R_{et}, \text{ МОм}, &= 1.2 + 0.1 \times \lg[\text{Тромбин}] \end{aligned} \quad (4)$$

При электростатической адсорбции нанесение авидина снижает сопротивление переноса заряда и емкость в результате частичной нейтрализации заряда поверхностного слоя. Закрепление аптамера меняет сопротивление разнонаправлено в зависимости от pH. В кислой среде сопротивление несколько снижается, возможно, из-за дополнительного привнесения отрицательного заряда олигонуклеотида, тогда как в щелочной среде сопротивление резко возрастает, возможно, в силу диффузионного торможения переноса маркера. Значение емкости меняется противоположным образом - увеличивается в кислой среде, что соответствует увеличению числа носителей заряда, одноименного заряду феррицианида, и снижается в щелочной в результате общей нейтрализации поверхностного слоя. Внесение тромбина в раствор приводит к закономерному изменению параметров импеданса, частично или полностью компенсирующему описанное влияние на импеданс авидина и тромбина. Наиболее закономерно изменение сопротивления и емкости поверхностного слоя в кислой среде.

Определение аутоиммунных антител к ДНК

Обнаружение аутоиммунных антител к ДНК является важным диагностическим признаком, устанавливающим аутоиммунную природу заболевания. При создании ДНК-сенсора для определения аутоиммунных антител к ДНК использовали нативную ДНК, иммобилизованную поверх полианилина и полифенотиазинов. Выделение, стандартизацию и обработку сывороток больных аутоиммунными заболеваниями - системной красной волчанкой (СКВ) и аутоиммунным тиреоидитом (АИТ), а также установление их титра проводили по стандартным методикам на кафедре эндокринологии Казанской государственной медицинской академии.

ДНК-сенсор на основе ПАНИ изготавливали на основе стеклоуглеродного электрода аналогично аптасенсору на тромбин. ДНК электростатически адсорбировали поверх слоя полимера и закрепляли кросс-сшивкой глутаровым альдегидом. Как показало сравнение вольтамперограмм и параметров электрохимического импеданса, ДНК образует с ПАНИ полиэлектролитный комплекс, стабилизируя его протонированную форму. Это выражается в характеристических изменениях пиков вольтамперограмм и рН-зависимости сопротивления переноса заряда и СРЕ.

В присутствии 1.0-2.0 мкг/см² ДНК при рН 2 - 3 наблюдалась инверсия зависимости потенциала сенсора от рН, возможно, из-за влияния ДНК на доступность различных участков полимера в реакции с допирующими кислотами.

Общая схема регистрации взаимодействия ДНК - белок представлена на рис.5. Количественную характеристику изменения потенциала после инкубирования сыворотки крови и ДНК на электроде проводили следующими способами:

- по положению минимума на кривых изменения потенциала во времени (метод минимумов)
- по смещению кривой изменения потенциала после прохождения минимума, аппроксимируемой линейной функцией (метод вычета базовой линии, см .рис.6).
- по разности потенциалов, зафиксированных через 20 мин. до и после инкубирования с сывороткой крови (метод фиксированного времени).

Если для измерения использовать термостатированную сыворотку крови больного СКВ, содержащую аутоиммунные антитела с наибольшим сродством к нативной ДНК, кривая изменения сигнала ДНК-сенсора при различных разведениях сыворотки имеет характерный сигмоидный вид, типичный для иммуноанализа. (рис.7).

В случае нетермостатированной сыворотки зависимость имеет колоколообразный характер. Спад сигнала в области малых разбавлений связан с влиянием белков сывороточного комплемента, которые в силу собственной буферной емкости компенсируют изменения в потоке ионов водорода в пределах поверхностного слоя.

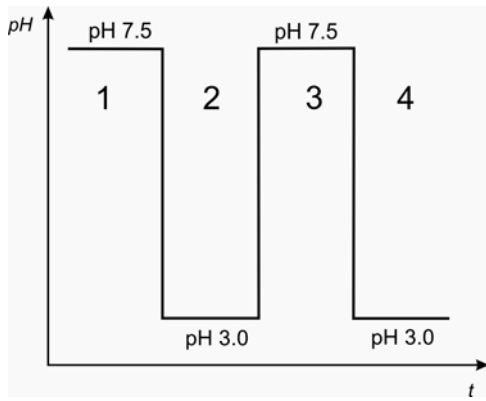


Рисунок 5 - Измерение сигнала потенциометрического ДНК-сенсора на основе ПАНИ.

- 1 - иммобилизация ДНК;
- 2 - измерение потенциала сенсора;
- 3 - инкубирование ДНК-сенсора;
- 4 - измерение сигнала ДНК-сенсора

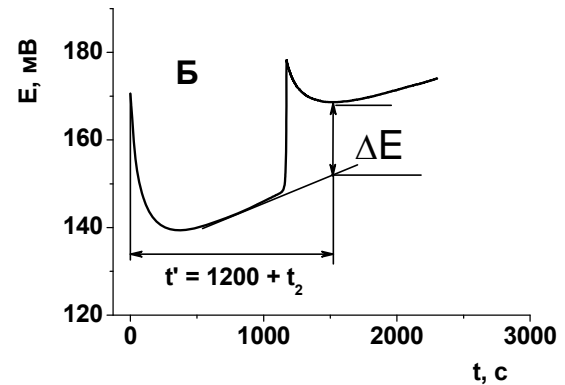
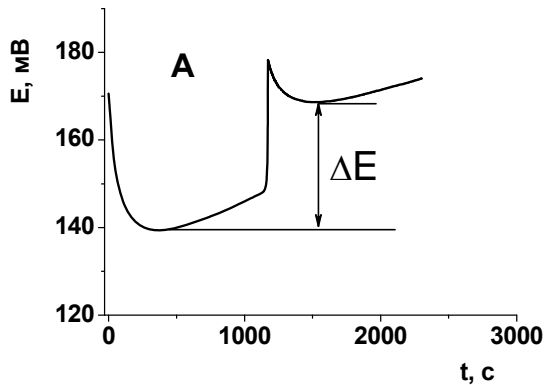


Рисунок 6 - Определение количественных характеристик взаимодействия ДНК-аутоиммунные антитела по динамическим кривым изменения потенциала ДНК-сенсора: А - метод минимумов, Б - метод вычитания базовой линии

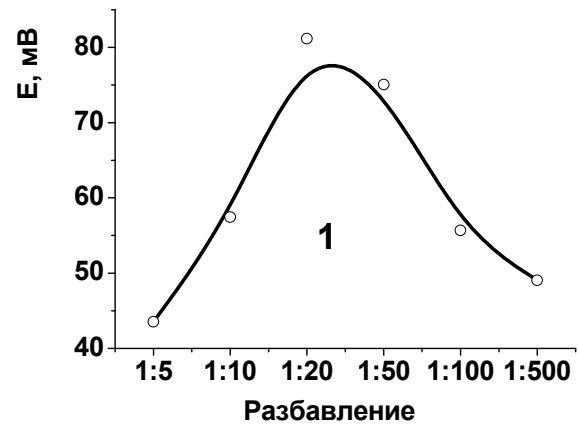
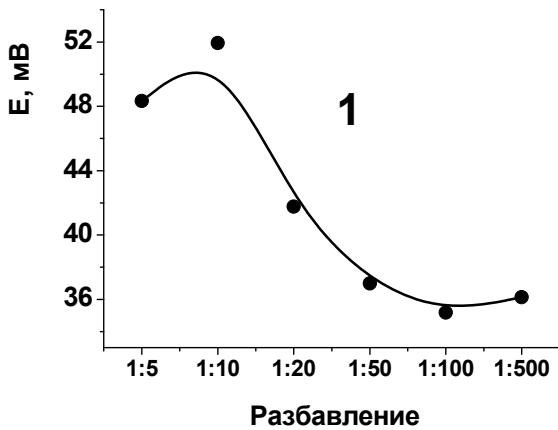


Рисунок 7 - Зависимость сигнала ДНК-сенсора от разведения термостатированной при 56°C (1) и нетермостатированной (2) сыворотки крови больного СКВ. Метод минимумов

Аналогичные зависимости были получены для сывороток больных АИТ. Максимум изменения сигнала приходится на разведение 1:20 - 1:50. В контрольном измерении вместо разбавленной сыворотки крови использовали рабочий буферный рас-

твор. При этом изменение сигнала ДНК-сенсора составляло для метода минимумов около 40 мВ, для метода вычитания базовой линии - 13 мВ при погрешности измерения сигнала ± 3 мВ. Если сыворотка крови не содержала антител к ДНК, изменения сигнала ДНК-сенсора носили нерегулярный характер и незначительно отличались от сигнала в контрольном измерении.

Сигнал также отсутствовал при замене одного из компонентов поверхностного слоя другим, не способным к специфическим взаимодействиям (включение вместо ПАНИ желатина или вместо ДНК нафиона). Вероятно, изменение потенциала комплекса ПАНИ+ДНК после инкубирования в сыворотке связано с влиянием антител на буферные свойства поверхностного слоя и доступность центров связывания для допирующих реагентов. Для участия допирующих ионов в генерировании сигнала были проведены эксперименты с ПАНИ, полученным в присутствии щавелевой, соляной и тетрафторбористоводородной кислот. Наилучшие результаты тестирования сывороток были получены, если в качестве электролита использовали соли кислот, присутствовавших в растворе на стадии полимеризации. Если же ПАНИ синтезировали в присутствии соляной кислоты, а измерения проводили на фоне сульфата натрия, динамика изменения сигнала сывороток больного и здорового донора совпадала.

Способ обнаружения аутоиммунных антител по потенциалам ДНК-сенсора был апробирован на реальных образцах сыворотки крови больных АИТ. Во всех случаях кривые разбавления сывороток с высоким значением ТПО (титр антител к тиреоидной пероксидазе) отличались закономерным увеличением сигнала в средней области разбавлений (1:20 - 1:50). Сигналы сывороток, показавших низкий титр антител, либо не отличались значимо от контрольного измерения, либо были ниже него в интервале разбавлений, отвечающем максимуму отклика на антитела. Результаты тестирования сывороток крови больных аутоиммунными заболеваниями позволили сформулировать критерии выявления антител к ДНК в зависимости от их этиологии (табл.3).

Разработанный метод определения антител к ДНК был также апробирован в контроле иммунизации лабораторных животных. Кривые разведения, полученные на сыворотках крови кроликов до и после их иммунизации комплексом ДНК - ДНКазы I, демонстрировали сходный максимум сигнала при разбавлениях около 1:50, хотя абсолютные значения сигнала были меньше, чем в случае антител к ДНК человека.

В области допирования ПАНИ введение ДНК снижает сопротивление переноса заряда за счет стабилизации солевой формы эмералдина, присутствие антител незначительно влияет на данный параметр.

ДНК-сенсоры на основе электродов, модифицированных полифенотиазинами. По сравнению с аптасенсором на тромбин следовало ожидать большего влияния ДНК на характеристики электрохимического превращения полифенотиазинов в силу

более высокой плотности заряда биополимера. Схема измерения не отличалась от измерений с помощью сенсоров на основе ДНК (рис.5). Кривые изменения потенциала во времени в отличие от аналогичных зависимостей, полученных на ПАНИ, не содержали минимумов и монотонно возрастали. Сигнал измеряли методом фиксированного времени. На рис.8 представлены зависимости сигнала от разбавления сывороток крови больного АИТ (ТПО 1200) и здорового донора.

Таблица 3. Диагностические критерии выявления аутоантител к ДНК. СКВ - системная красная волчанка, АИТ - аутоиммунный тиреоидит

Заболевание	Разбавление сыворотки	Метод вычитания базовой линии		Метод минимумов	
		Е, мВ	%	Е, мВ	%
Здоровый донор	1:20	13	3	45	0
	1:50	15	15	53	17
СКВ	1:20	26	94	81	80
	1:50	23	72	75	67
АИТ	1:20	23	70	69	53
	1:50	19	50	71	58

Результаты потенциометрического определения антител коррелируют с данными импедиметрических измерений (табл.4).

Таблица 4. Характеристики импеданса ДНК-сенсоров. Разбавление сыворотки 1:20

Модификатор	pH 3.0		pH 7.2	
	R _{ct} , кОм	CPE, мкФ	R _{ct} , кОм	CPE, мкФ
ПАНИ	18.6	2.7	247	2.3
ПАНИ+ДНК	12.8	3.6	372	1.8
ПАНИ+ДНК+АИТ (ТПО 1200)	14.5	7.9	268	1.8
ПАНИ +ДНК+ СКВ	8.8	20.0	244	3.3

При погрешности измерения 10% (для шести измерений) наблюдаемые изменения сопротивления после контакта ДНК-сенсора с разбавленной сывороткой незначимы. При переходе от ПАНИ к комплексу ПАНИ+ДНК емкость возрастает в 1.5 раза в силу увеличения числа носителей заряда в поверхностном слое. К тому же эффекту приводит инкубирование ДНК-сенсора в сыворотке, причем для антител к нативной

ДНК (сыворотки крови больного СКВ) различие в значениях емкости намного больше, чем для сыворотки больного АИТ. При рН 7.2 осаждение ДНК поверх слоя ПАНИ увеличивает сопротивление переноса заряда почти в 1.5 раза. ДНК придает отрицательный заряд поверхностному слою незаряженного ПАНИ, что тормозит перенос в пленку феррицианида. Антитела независимо от их происхождения частично компенсируют отрицательный заряд ДНК, что несколько снижает сопротивление. Изменения емкости при рН 7.2 незначимы. Они отражают постоянство распределения заряда в слое ПАНИ, который остается при данном рН незаряженным при всех вариациях состава биоконпонентов слоя.

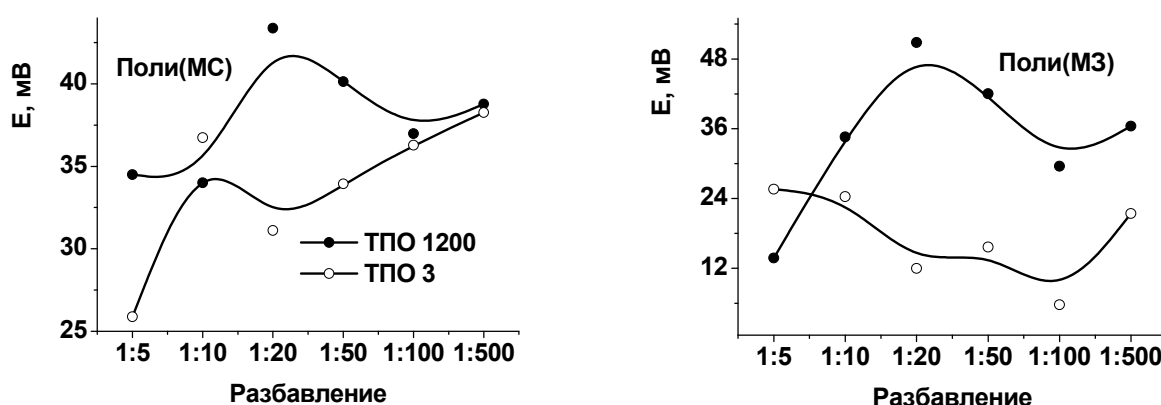


Рисунок 8 - Зависимость сигнала ДНК-сенсора на основе поли(МС) и поли(МЗ) от разбавления сыворотки крови больного АИТ (ТПО 1200) и здорового донора (ТПО 3)

Наибольшее различие в ходе кривых наблюдалось при разбавлениях 1:20... 1:50. Поли(МЗ) дает несколько лучшее разрешение кривых, чем поли(МС). Термостаивирование сыворотки приводит к монотонному изменению сигнала сенсора в соответствии с (5).

$$E, \text{ мВ} = (44.0 \pm 1.0) + (10.5 \pm 1.2) \lg V, n=7, R = 0.9709 \quad (5)$$

Здесь V - абсолютное значение разбавления сыворотки (например, для разбавления 1:1 $V = 1/(1+1) = 0.5$), обратно пропорциональное концентрации антител.

ДНК-сенсоры на основе полифеноптиазинов позволяют надежно различить сыворотки больных и здоровых доноров в области средних разбавлений, совпадающих с условиями определения тех же антител с помощью сенсоров на основе ПАНИ

Изучено влияние количества ДНК в поверхностном слое и продолжительности инкубирования ДНК-сенсора на регистрируемый сигнал. И для поли(МС), и для поли(МЗ) с увеличением продолжительности инкубирования сигнал растет до 10-12 минуты, после чего падает в 1.5 раза, по-видимому, вследствие слишком плотного заполнения поверхностного слоя белком. Влияние содержания ДНК максимально в области средних концентраций (рис. 9). По-видимому, более пологий пик в случае

поли(МС) объясняется его более высокой поверхностной концентрацией, а значит, повышенной способностью связывать ДНК. Последующее снижение отклика связано с диффузионным торможением переноса ионов водорода через слой ДНК. Биосенсоры на основе поли(МС) и поли(МЗ) демонстрируют также близкую зависимость сигнала от концентрации индифферентного электролита.

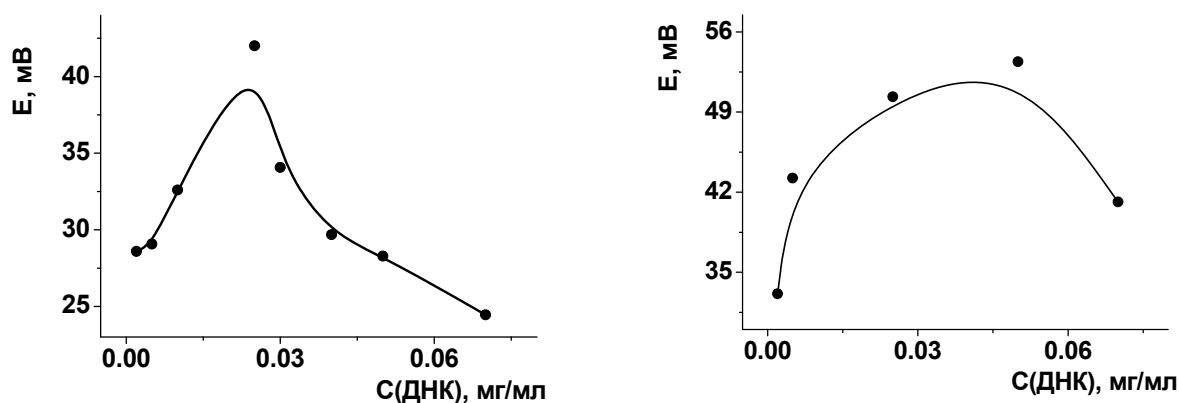


Рисунок 9 - Влияние концентрации ДНК в смеси для иммобилизации на сигнал ДНК-сенсора на основе поли(МЗ) и поли(МС). Сыворотка крови больного АИТ, ТПО 1200, разбавление 1:50.

В табл.5 представлено сравнение характеристик сигнала ДНК-сенсоров на основе различных модификаторов при тестировании сывороток крови больного АИТ (ТПО 1200) и здорового донора (ТПО 3) при разбавлении 1:20.

Таблица 5. Сравнительная характеристика сигнала ДНК-сенсоров на основе различных модифицирующих слоев. 1 - Метод вычитания базовой линии; 2 - Метод минимумов; 3 - Метод фиксированного времени

Модификатор	ТПО 1200			ТПО 3		
	1	2	3	1	2	3
ПАНИ + ДНК	20	55		13	45	
Поли(МЗ) + ДНК			51			12
Поли(МС)+ ДНК			43			31
Желатин + ДНК			33			22
ПАНИ + Нафион	10	37	24	12	54	31

Хотя метод минимумов более удобен для использования, он дает меньшее разрешение сигналов сывороток крови здорового и больного доноров. ДНК-сенсор на основе поли(МЗ) дает не только бóльшие абсолютные значения сигнала, но и лучше других различает специфическое и неспецифическое связывание белков. При этом

следует отметить, что тот же сенсор имеет несколько худшие показатели воспроизводимости и стабильности поверхностного слоя. Результаты импедиметрических измерений в системе полифенотиазины - ДНК - антитела приведены в табл.6.

Таблица 6. Характеристики электрохимического импеданса ДНК-сенсоров на основе полифенотиазинов. Сыворотка АИТ (ТПО 1200)

Модификатор	рН 3.0		рН 7.2	
	R _{et} , кОм	CPE, мкФ	R _{et} , кОм	CPE, мкФ
Поли(МЗ)	210	17	180	14
Поли(МЗ) + ДНК	222	18	91	14
Поли(МЗ) + ДНК + АТ	289	17	122	8
Поли(МС)	87	25	58	19
Поли(МС) + ДНК	172	13	139	6
Поли(МС)+ ДНК + АТ	130	6	42	3

Для поли(МЗ) внесение в состав поверхностного слоя ДНК незначительно влияет на сопротивление и CPE при рН 3.0 и в 2 раза снижает сопротивление при рН 7.2. Закрепление антител поверх ДНК увеличивает диффузионное сопротивление переноса редокс-маркера (эквиволярной смеси Fe(CN)₆^{3-/4-}) и значения R_{et} независимо от рН раствора. В щелочной области, где аффинность взаимодействия ДНК-белок выше, при этом несколько снижается емкость поверхностного слоя, вероятно, за счет экранирующего действия белков, компенсирующих отрицательный заряд биополимера. Согласованное изменение сопротивления переноса заряда и емкости поверхностного слоя при переходе от рН 7.2 к рН 3.0 в присутствии антител к ДНК косвенно подтверждает предположение о том, что сигнал ДНК-сенсора определяется смещением редокс-потенциала полифенотиазина, а не переносом низкомолекулярных допирующих агентов, как в случае полианилина.

Для поли(МС) изменение сопротивления переноса заряда происходит в том же направлении, что и для поли(МЗ), но несколько больше по величине. Очевидно, более высокая поверхностная концентрация данного модификатора усиливает вклад электростатических взаимодействий с ДНК в пределах поверхностного слоя. Присоединение антител к слою поли(МС)+ДНК ведет к снижению емкости поверхностного слоя в 2 раза. Вероятно, ДНК не полностью закрывает поли(МС), так что взаимодействие белка происходит не только с ДНК, но и неспецифически с полимерной формой красителя.

ВЫВОДЫ

1. Модификация золотых и стеклоуглеродных электродов электрополимеризованными материалами улучшает условия иммобилизации ДНК, олигонуклеотидов и аптамеров и позволяет получить потенциометрический и пьезометрический сигнал об их взаимодействии со специфически связывающимися белками (антитела к ДНК, α -тромбин) или комплементарными олигонуклеотидами.
2. Иммобилизация ДНК-зонда на тонкопленочных золотых электродах, покрытых сополимером тирамина и *o*-аминофенола, позволяет проводить определение до $n \times 10^{-10}$ моль комплементарных олигонуклеотидов по току окисления маркера - гидрохинона, скорость переноса которого меняется в зависимости от состава поверхностного слоя и комплементарности зонда мишени.
3. Разработаны аптасенсоры на α -тромбин на основе пьезокварцевых резонаторов с золотыми электродами, модифицированными полимерными формами метиленового синего и метиленового зеленого, авидином и биотинированным аптамером на α -тромбин, позволяющие определять до 5 нМ α -тромбина. Применение полимерных матриц позволило снизить предел обнаружения и повысить селективность сигнала в присутствии неспецифических белков (на примере альбумина) по сравнению с традиционными методами иммобилизации.
4. Показана возможность потенциометрического и импедиметрического определения α -тромбина на стеклоуглеродных электродах, модифицированных полианилином и полифенотиазинами, по влиянию определяемого белка на рН-зависимость потенциала полимерного слоя и его проницаемость для носителей заряда.
4. Предложен новый способ детектирования аутоиммунных антител к ДНК в сыворотке крови больных различной этиологии по изменению электрохимических характеристик полиэлектролитных комплексов ДНК с электрополимеризованными материалами (потенциал сенсора, сопротивление переноса заряда и емкость поверхностного слоя), измеряемых до и после контакта биосенсора с тестируемой сывороткой. В случае полианилина изменение потенциала обусловлено влиянием процессов допирования на электрохимические свойства полимера при изменении рН раствора. Для полифенотиазинов сигнал биосенсора связан с влиянием белков на рН-зависимость окислительно-восстановительного потенциала полимерных форм красителей. Разработаны диагностические критерии для антител к ДНК в сыворотках крови больных системной красной волчанкой и аутоиммунным тиреоидитом.

Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Порфирьева, А.В. Амперометрический ДНК-сенсор на основе планарных золотых электродов, модифицированных сополимером тирамина и о-аминофенола [Текст]/ А.В.Порфирьева, Е.Е.Стойкова, С.В.Белякова, Г.А.Евтюгин, Г.К.Будников // Ученые записки Казан.ун-та. Сер. ест.наук.- 2006.- Т.148, кн.2.- С.9-20.
2. Порфирьева, А.В. Потенциометрический ДНК-сенсор для определения аутоиммунных антител к ДНК [Текст]/ А.В.Порфирьева, Г.А.Евтюгин, Е.Ю.Подшивалина, Л.И.Анчикова, Г.К.Будников // Журн.аналит.химии.- 2007.- Т.62, № 12.- С.1309-1316.
3. Porfirieva, A. Polyphenothiazine modified electrochemical aptasensor for detection of human α -thrombin [Text]/ A.Porfirieva, G.Evtugyn, T.Hianik // Electroanalysis.- 2007.- V.19.- P.1915-1920.

Тезисы докладов:

1. Будников, Г.К. Углеродные электроды, модифицированные полианилином, и биосенсоры на их основе [Текст]/ Г.К.Будников, Г.А.Евтюгин, Е.Е.Стойкова, А.Н. Иванов, О.В.Масленникова, А.В. Порфирьева // "Электроаналитика - 2005". Всерос. научн. конф. с межд.участием. Екатеринбург, 23-27 мая 2005 г. Тез.докл.- 2005.- С.6.
2. Евтюгин Г.А. Биохимические и химические сенсоры на основе электродов, модифицированных феноптиазинами [Текст]/ Г.А.Евтюгин, Г.К.Будников, Е.Е.Стойкова, А.В.Порфирьева, Р.П.Шалямова, С.В.Белякова // Труды Межд.конф."Химия, химическая технология и биотехнология", Томск, 11-16 сент. 2006. - Т.2.- С.220-221.
3. Budnikov, H.C. Phenothiazine derivatives as electrochemical indicators for DNA sensors [Text]/ H.C.Budnikov, O.E.Goldfarb, S.V.Beljakova, G.A.Evtugyn, E.V.Suprun, A.V. Porfirieva, V.G.Vinter / 17 Intern.Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics. Florence, Italy, June 19-24.- 2003.- P.198.
4. Evtugyn, G.A. Tyramine copolymers as matrix for the development of DNA sensors [Text]/ G.A. Evtugyn, S.V. Beljakova, A.V. Porfirieva, E.E. Stoikova, H.C. Budnikov // Workshop on "New trends in nucleic acid based biosensors" . Book of Abstracts. Firenze, 25-28 Oct. 2003.- P.49.
5. Budnikov, H.C. DNA polyelectrolyte complexes as recognition elements for anti-DNA antibodies detection [Text]/ H.C.Budnikov, G.A.Evtugyn, A.V.Porfirieva, E.Ju. Podshivalina, L.I.Anchikova, G.R.Vagapova // International Congress on Analytical Sciences ICAS-2006, 25-30 June, Moscow, Russia. Book of Abstracts.- 2006.- V.1.- P.134.
6. Евтюгин, Г.А. Новые электрохимические сенсоры для регистрации взаимодействий ДНК - белок [Текст] / Г.А.Евтюгин, А.В.Порфирьева, Г.К.Будников, Т.Хианик // XVIII Менделеевский съезд по общей и прикладной химии (23-28 сентября 2007 г.). Тез. докл., Москва, 2007.- Т.4.- С.47.
7. Evtugyn, G.A. Potentiometric DNA-sensors for the detection of autoimmune diseases based on electropolymerized materials [Text] / G.A.Evtugyn, A.V.Porfirieva, M.S. Cheburova, H.C. Budnikov // Third International Workshop on "Biosensors for food safety and environmental monitoring". October 18-20, 2007, Fez, Morocco.- 2007.- P.19.
8. Евтюгин, Г.А. Электрополимеризованные материалы в составе электрохимических сенсоров: генерирование сигнала, микроконцентрирование и разделение [Текст] / Г.А. Евтюгин, А.Н.Иванов, Г.К.Будников, А.В.Порфирьева // "Аналитика России" Матер. II Всерос. конф. с межд.участием. Краснодар - 2007.- С.77.
9. Порфирьева, А.В. Потенциометрический сенсор на основе комплексов ДНК-полианилин для определения аутоиммунных антител к ДНК [Текст] / А.В. Порфирьева, Е.Ю. Подшивалина // VI Респ. школа студентов и аспирантов " Жить в XXI веке ". Казань.- 2006.- С. 8-10.
10. Порфирьева А.В. Электрохимические ДНК-сенсоры на основе электродов, модифицированных полианилином, для определения антител к ДНК [Текст] / А.В.Порфирьева, Е.Ю. Подшивалина, М.С.Чебурова, О.В.Масленникова // V Научн.конф. молодых ученых, аспирантов и студентов научно-образовательного центра КГУ "Материалы и технологии XXI века", Казань, 26-27 апреля 2005 г. Тез.докл.- 2005.- С.70.