

На правах рукописи

ГОЛЬДФАРБ ОЛЬГА ЭДУАРДОВНА

**ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ ДНК-СЕНСОР С ФЕРМЕНТАТИВНЫМ
УСИЛЕНИЕМ СИГНАЛА**

02.00.02 – Аналитическая химия

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Казань - 2005

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

Научный руководитель: доктор химических наук
Евтюгин Геннадий Артурович

Официальные оппоненты: доктор химических наук,
профессор Евгеньев Михаил Иванович

доктор химических наук,
профессор Бабкина Софья Сауловна

Ведущая организация: Химический факультет Московского государственного университета им.М.В.Ломоносова

Защита диссертации состоится 15 декабря 2004 г. в 14 ч. на заседании диссертационного совета К 212.081.04 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, Научная часть.

Автореферат разослан " ____ " ноября 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, кандидат химических наук

Л.Г.Шайдарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ*)

Актуальность темы. Взаимодействия низкомолекулярных соединений с нуклеиновыми кислотами играют фундаментальную роль в регуляции процессов в передаче генетической информации, биосинтеза белка, в онкогенезе и ряде других биохимических процессов. Часть исследований таких процессов может быть использована в биосенсорных технологиях, основанных на регистрации аффинных взаимодействий с участием ДНК на поверхности преобразователя сигнала. Такие ДНК-сенсоры дают ценную информацию о специфичности связывания и молекулярных механизмах распознавания. Они также могут применяться для высокочувствительного определения лекарственных препаратов и генотоксических факторов. На аналитические характеристики определения низкомолекулярных соединений во многом влияют способы регистрации сигнала. В электрохимических сенсорах для этого применяют маркеры - соединения, характеристики окисления/восстановления которых меняются в результате реакций на электроде с участием ДНК. В качестве маркера обычно используют соединения, способные внедряться в спираль ДНК (интеркалировать). Однако, многие соединения, будучи эффективными интеркаляторами, окисляются на электродах с большим перенапряжением, необратимо, иногда с образованием нерастворимых продуктов олигомеризации и/или хемосорбции. Это не только затрудняет регенерацию ДНК-сенсора после измерения, но и усложняет интерпретацию сигнала, поскольку параллельно взаимодействию с ДНК происходит изменение условий диффузионного переноса маркеров к поверхности сенсора. В этой связи, большие возможности имеет включение в генерирование сигнала ДНК-сенсора каталитическое превращение маркера, повышающее чувствительность измерения аффинных взаимодействий с участием ДНК.

Целью настоящей работы явилось создание нового ДНК-сенсора, включающего для усиления сигнала маркеров (производных фенотиазина) индикаторный фермент (пероксидазу), обеспечивающий каталитическую регенерацию активной формы маркера в электродной реакции.

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

- определить условия взаимодействия фенотиазиновых маркеров (метиленового синего и метиленового зеленого) с компонентами биочувствительного

*) Научным консультантом работы является зав.кафедрой аналитической химии Казанского государственного университета, д.х.н., проф. Будников Герман Константинович

слоя (ДНК и пероксидаза), необходимые для регенерации активной формы индикатора и регистрации аффинных взаимодействий с участием ДНК на поверхности сенсора;

- найти рабочие условия иммобилизации пероксидазы и нативной ДНК в поверхностном слое, обеспечивающие воспроизводимый сигнал ДНК-пероксидазного сенсора и высокую чувствительность определения низкомолекулярных соединений - участников аффинных взаимодействий;
- изучить механизм взаимодействия фенотиозиновых маркеров, лекарственных препаратов, загрязняющих веществ с ДНК и установить механизм влияния природы маркеров, определяемых соединений и условий измерения на сигнал ДНК-пероксидазного сенсора, его аналитические и операционные характеристики;
- разработать высокочувствительные методы определения указанных соединений и предложить способы контроля селективности отклика биосенсора путем варьирования природы медиатора и условий измерения сигнала.

Научная новизна работы заключается в том, что:

- предложен и реализован на примере определения различных низкомолекулярных соединений биологического значения новый способ регистрации аффинных взаимодействий с участием ДНК, основанный на вовлечении электрохимически активного маркера - производного фенотиазина - в сопряженную реакцию ферментативного окисления с электрохимической регенерацией активной формы маркера;
- обосновано использование в составе ДНК-пероксидазных сенсоров для регистрации аффинных взаимодействий двух маркеров - метиленового синего и метиленового зеленого, обеспечивающих дифференциацию сигнала в зависимости от природы определяемого соединения;
- установлен механизм генерирования сигнала ДНК-пероксидазного сенсора для соединений, различным образом реагирующих с ДНК, и предложены способы направленного изменения чувствительности сигнала ДНК-пероксидазного в отношении определяемых соединений - сульфаниламидов, антрациклинов, загрязняющих веществ;
- показана возможность использования ДНК-пероксидазного сенсора для регистрации повреждающего действия на ДНК гидроксидных радикалов и защитного действия антиоксидантов.

Практическая значимость работы состоит в том, что:

- предложены простые и удобные в использовании способы модификации стеклоуглеродных электродов нативной и денатурированной ДНК и перок-

сидазой, обеспечивающие возможность каталитической регенерации маркера в сопряженной электрохимической и биохимической реакции;

- разработаны методики определения сульфаниламидов, рубомицина, доксо-рубицина, промазина и цефтазида в нано- и микромолярном диапазоне их концентраций;
- предложены подходы к оценке генотоксических свойств загрязнителей окружающей среды по их влиянию на сигнал ДНК-пероксидазного сенсора.

На защиту выносятся:

- результаты изучения электрохимического поведения фенотиазиновых маркеров на стеклоуглеродном электроде, модифицированном ДНК, пероксидазой и их смесью и вывод о механизме взаимодействия маркеров с компонентами биочувствительного слоя и его влиянии на сигнал биосенсора;
- новый способ регистрации аффинных взаимодействий низкомолекулярных соединений с нативной ДНК по току восстановления маркеров – метиленового синего и метиленового зеленого - в присутствии определяемых соединений, отражающему скорость каталитической регенерации маркера в каталитическом цикле;
- результаты изучения влияния лекарственных соединений на сигнал ДНК-пероксидазного сенсора и вывод о влиянии механизма их взаимодействия с ДНК на характеристики их определения в зависимости от природы маркера и условий измерения сигнала;
- оценка влияния ДНК-повреждающих факторов (на примере гидроксильных радикалов) и загрязняющих веществ на поведение ДНК-пероксидазного сенсора и вывод о возможности его использования для предварительного скрининга уровня загрязнения окружающей среды.

Апробация работы. Результаты исследований докладывались на Международном симпозиуме "Biocatalysis-2002. Fundamentals and Applications" (Москва, 2002), 12 Международной конференции по аналитической химии EUROANALYSIS 12 (Дортмунд, Германия, 2002), 17 Международном симпозиуме по биоэлектрохимии (Флоренция, Италия, 2003), Международном симпозиуме по ДНК-сенсорам "New trends in nucleic acid based biosensors" (Флоренция, Италия, 2003), VI Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа (Уфа, 2004), II Всероссийском симпозиуме "Тест-методы анализа" (Саратов, 2004), Всероссийской научной конференции с международным участием "Электроаналитика-2005" (Екатеринбург, 2005), 7 Международном симпозиуме по кинетическим методам анализа КАС-2004 (Рим, Италия, 2004), Всероссийской конференции по аналитической химии "Аналитика России-2004" (Москва,

2004), III научной конференции молодых ученых, аспирантов и студентов НОЦ КГУ "Материалы и технологии XXI века", Итоговой научной конференции Казанского государственного университета (Казань, 2004).

Основные результаты изложены в 3 статьях и 7 тезисах докладов.

Диссертация выполнена при поддержке РФФИ (грант № 03-03-32492 "Электрохимические ДНК-сенсоры с ферментативным усилением сигнала"), Санкт-Петербургского конкурсного центра в области естественных наук, научно-образовательной программы CRDF и Минобрнауки РФ (НОЦ КГУ "Материалы и технологии XXI века" REC-007), ИНТАС (грант 00-0870 "Простые и чувствительные способы определения ксенобиотиков в окружающей среде и продуктах питания").

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 145 страницах машинописного текста, включает 44 рисунка и 14 таблиц. Состоит из введения, 5 глав, выводов и списка использованных библиографических источников, включающего 178 ссылок на отечественные и зарубежные работы.

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 проблемы конструирования ДНК-сенсоров для определения низкомолекулярных соединений, рассмотрены способы электрохимической регистрации сигнала ДНК-сенсоров и результаты их использования для определения соединений биологического значения.

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 РАБОТЫ

Экспериментальная часть

Использовали дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) из эритроцитов цыплят, магниевая соль, пероксидаза из хрена (КФ 1.11.1.7) производства "Биофарм", Казань, 6 Е/мг, и "Sigma", 250 Е/мг. Органическими субстратами пероксидазы служили гидрохинон ("Reanal", Венгрия), метиленовый синий (МС) и метиленовый зеленый (МЗ) ("Aldrich", не менее 99% основного вещества), промазин ("Sigma"), стабилизатором – желатин фотографический. Для иммобилизации биологических компонентов путем кросс-сшивки использовали 20% глутаровый

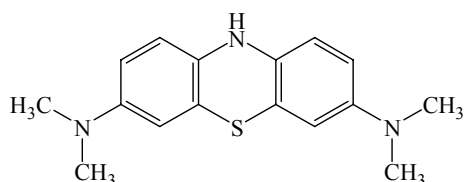
альдегид ("Lancaster", Англия). Все другие используемые реагенты были марок х.ч. и analytical grade. Измерения проводили в фосфатном буферном растворе, рН 6.8-7.0.

Амперометрические измерения проводили в трехэлектродной ячейке с хлоридсеребряным электродом сравнения (Ag/AgCl) и платиновым противоэлектродом в режиме постоянноточковой и квадратно-волновой вольтамперометрии с помощью вольтамперографов CV-51W ("BAS Inc.", США) и Экотест-ВА ("Эконикс-Эксперт", Москва). Для создания ферментных сенсоров использовали стеклоуглеродные электроды (СУ2500, НИИГрафит, Москва, и BAS).

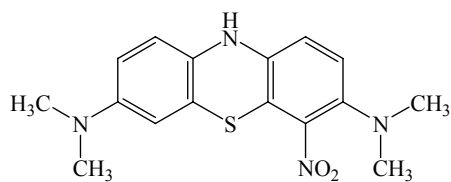
Иммобилизацию ДНК и пероксидазы проводили, последовательно нанося на электроды растворы компонентов с промежуточным высушиванием каждого слоя, после чего электроды обрабатывали раствором глутарового альдегида и промывали в рабочем буферном растворе. Сигналом биосенсоров служил ток пика восстановления окисленных форм маркеров, регистрируемый через 10 мин. после добавления в раствор 1.0 мМ пероксида водорода относительно фоновых значений тока в отсутствие субстратов.

Выбор условий измерения сигнала ДНК-пероксидазного сенсора

Фенотиазиновые красители МС и МЗ (1) окисляются на стеклоуглеродном электроде с образованием сопряженных пиков окисления/восстановления вблизи -100 мВ отн. Ag/AgCl.



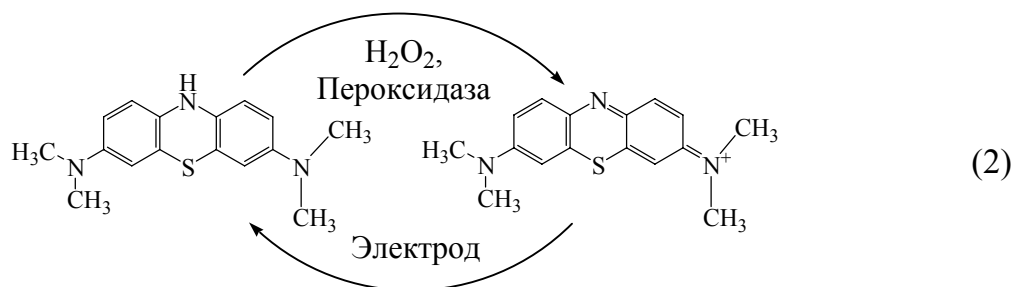
Метиленовый синий (МС)



(1)

Метиленовый зеленый (МЗ)

Высота пиков растет с увеличением продолжительности инкубирования, при времени контакта до 10 мин. адсорбция маркеров носит обратимый характер. Присутствие на электроде ДНК и пероксидазы увеличивает сигнал МС за счет его вовлечения в реакцию специфического связывания с ДНК и участия в реакции пероксидазного окисления. В результате реализуется субстратный цикл, в котором окисленная форма МС восстанавливается в электродной реакции, а восстановленная форма МС окисляется в биохимической стадии (2). Для МЗ регистрируемые токи окисления оказались в 5-10 раз ниже, чем для МС той же концентрации. Это связано с меньшей сорбционной активностью маркера и низкой эффективностью его пероксидазного окисления.



Характер взаимодействия МЗ с ДНК подтвержден изучением термостабильности ДНК: в его присутствии происходит закономерное смещение температуры плавления и положения пиков на термограммах, что говорит о специфическом связывании маркера со спиралью нативной ДНК. Термическая денатурация ДНК перед ее включением в состав биосенсора увеличивает сигнал МЗ по сравнению с нативной ДНК в результате увеличения доступности центров связывания. Однако в силу меньшей воспроизводимости состава и свойств биочувствительного слоя и, как следствие, сигнала маркера рабочие концентрации МЗ при использовании в биосенсоре денатурированной ДНК были выбраны выше - 4.0 мкМ (для биосенсора на основе нативной ДНК - 0.4 мкМ).

МЗ связывается с ДНК неспецифически, вероятно, в результате электростатических взаимодействий с отрицательно заряженным фосфатным остовом спирали. Максимальные сигналы МЗ наблюдали при модификации электрода денатурированной ДНК. Эффективность превращения МЗ на ДНК-пероксидазном сенсоре и на пероксидазном сенсоре в отсутствие ДНК практически одинакова. Результаты определения фенотиазиновых маркеров представлены в табл.1.

Наиболее стабильные сигналы пероксидазного и ДНК-пероксидазного сенсора были получены при концентрации пероксида водорода 1.0 мМ. Повышение его концентрации до 5.0 мМ увеличивает погрешность измерения с 4.2 до 6%. Далее происходит снижение регистрируемых токов, возможно, в силу неферментативного окисления части маркера. Концентрация фосфатного буферного раствора в интервале 0.001-0.1 М на сигнал биосенсоров сенсора не влияет. Влияние рН и количества ДНК на сигнал биосенсоров представлено на рис. 1.

Иммобилизация пероксидазы сдвигает рН-максимум ферментативной реакции с рН 5.5-6.5 для нативного фермента до рН 7.0 для ДНК-пероксидазного сенсора. Сигнал максимален при содержании ДНК на поверхности электроде 0.0025 мг/мл. Дальнейшее увеличение количества ДНК приводит к резкому спа-

ду токов в силу диффузионного торможения переноса маркера к поверхности электрода.

Таблица 1. Аналитические характеристики определения МС и МЗ на стеклоуглеродном электроде, модифицированном ДНК и пероксидазой

Модификатор	Маркер	$i, \text{мкА} = a + b \times (C, \text{мкМ})$			$C_{\text{lim}}, \text{мкМ}$	$i_{\text{max}}, \text{мкА}$
		a	b	R		
-	МС	0.24 ± 0.05	0.108 ± 0.007	0.991	0.3	-
	МЗ	-0.03 ± 0.02	0.043 ± 0.005	0.985	5.0	-
ДНК	МС	-0.03 ± 0.02	0.19 ± 0.001	0.9918	0.3	10
денДНК	МС	1.10 ± 0.22	0.32 ± 0.01	0.9951	5.0	34
	МЗ	-0.07 ± 0.03	0.12 ± 0.003	0.9976	2.0	12
Пероксидаза	МС	0.083 ± 0.003	1.50 ± 0.11	0.9981	0.04	17
	МЗ	0.27 ± 0.06	0.063 ± 0.002	0.9956	2.5	11
ДНК-пероксидаза	МС	-0.13 ± 0.04	2.30 ± 0.06	0.9870	0.01	27
	МЗ	0.14 ± 0.02	0.054 ± 0.001	0.9996	0.5	7.5
денДНК - пероксидаза	МС	0.17 ± 0.31	2.10 ± 0.07	0.9984	0.3	30
	МЗ	0.75 ± 0.10	0.05 ± 0.005	0.9732	2.0	10

Примечания: денДНК – термически денатурированная ДНК, C_{lim} – предел обнаружения, i_{max} – предельное значение сигнала окисления маркеров или сигнала биосенсора в присутствии 1.0 мМ пероксида водорода

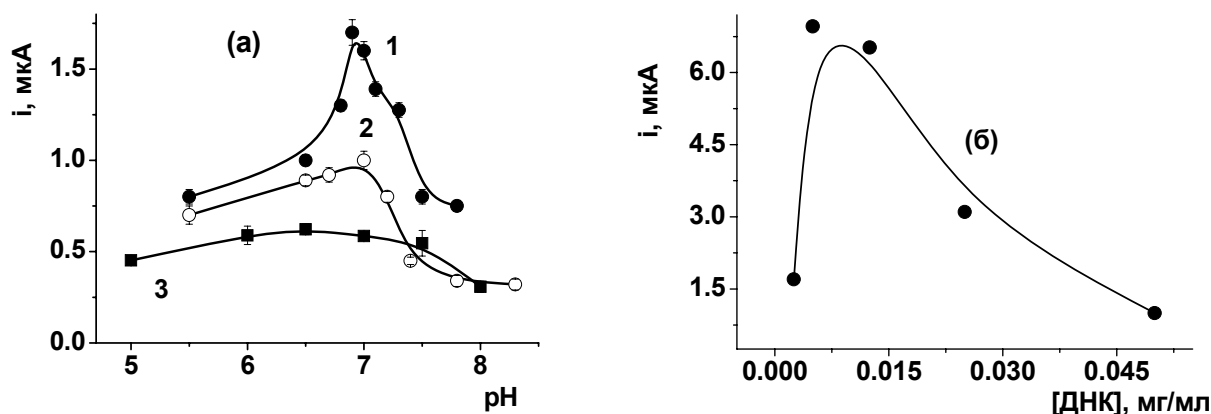


Рисунок 1. Влияние pH (а) и количества ДНК на электроде (б) на сигналы биосенсоров. (1) – пероксидазный сенсор, МС 1.0 мкМ; (2) – пероксидазный сенсор, МЗ 15 мкМ; (3) – окисление 20 мкМ МС на стеклоуглеродном электроде (4) – ДНК-пероксидазный сенсор, МС 0.4 мкМ. Измерения в фосфатном буферном растворе, H_2O_2 1.0 мкМ

Определение лекарственных препаратов

Сульфаниламиды. Сульфаметоксазол (SMX), сульфатиазол (ST), сульфатуанидин (SG), сульфамеразин (SMZ) и сульфадиазин (SDZ) влияют на сигнал ДНК-пероксидазного сенсора в зависимости от природы маркера и условий их контакта с биосенсором. Предварительно было показано, что изученные препараты не влияют на активность нативной пероксидазы и не меняют сигнала пероксидазного сенсора в отсутствие ДНК в поверхностном слое. При концентрации маркера 0.4 мкМ (МС, рис.2) и продолжительности контакта 10 мин. наблюдается обратимое снижение сигнала ДНК-пероксидазного сенсора МС в наномолярном диапазоне концентраций сульфаниламидов. С наибольшей чувствительностью определяется SMX.

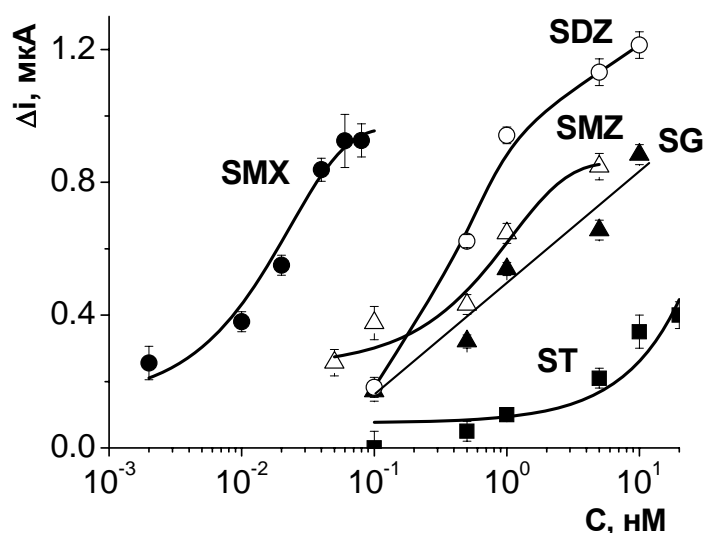


Рисунок 2. Определение сульфаниламидных препаратов с помощью ДНК-пероксидазного сенсора. Инкубирование 10 мин. МС 0.4 мкМ, H_2O_2 1.0 мМ. Квадратно-волновая вольтамперометрия, фосфатный буферный раствор, рН 7.0

При увеличении концентрации сульфаниламидов до 0.1-10 мкМ изменение сигнала МС носит менее регулярный характер. Происходит ослабление их ингибирующего действия, а для SMX и ST проявляется незначительное (до 10-25%) увеличение сигнала. Аналогичное влияние оказывает увеличение продолжительности инкубирования с 10 мин до 40-60 мин. Увеличение концентрации МС также снижает влияние сульфаниламидов на сигнал биосенсора.

При использовании в качестве маркера МЗ сигнал ДНК-пероксидазного сенсора меняется после инкубирования в растворе 0.11-10 мкМ сульфаниламидов разнонаправленно. SMX, ST и SG вызывают слабое увеличение сигнала, то-

гда как SD - его уменьшение. Аналитические характеристики определения сульфаниламидов приведены в табл.2.

Включение в состав биосенсора термически денатурированной ДНК увеличивает абсолютное значение и наклон градуировочных зависимостей сульфаниламидных препаратов. Однако поскольку измерения проводили с более высокой концентрацией маркера (4.0 мкМ), определяемые концентрации сульфаниламидов остаются ниже, чем в случае нативной ДНК (рис.3, ср.рис.2 и табл.2). Происходит сближение градуировочных зависимостей отдельных сульфаниламидных препаратов, а также характера их влияния на МС и МЗ.

Таблица 2. Аналитические характеристики определения сульфаниламидов с помощью ДНК-пероксидазного сенсора

Сульфаниламид	$\Delta i, \text{мкА} = a + b \times \lg(C, \text{мкМ})$			$C_{\text{lim}}, \text{нМ}$	Интервал определяемых концентраций, $C, \text{нМ}$
	a	b	R		
Маркер МС					
SMX	2.84±0.38	0.47±0.07	0.9563	0.004	0.01-0.1
ST	0.68±0.08	0.18±0.02	0.9660	0.1	0.4-20
SDZ	2.31±0.22	0.51±0.07	0.9718	0.04	0.1-10
SMZ	1.47±0.15	0.28±0.04	0.9685	0.1	0.15-15
SG	1.51±0.13	0.34±0.05	0.9753	0.05	0.1-10
Маркер МЗ				$C_{\text{lim}}, \text{мкМ}$	$C, \text{мкМ}$
SMX	0.13±0.17	- 0.89±0.15	-0.9289	0.4	0.5-5
ST	-0.02±0.14	- 1.15±0.14	-0.9643	0.4	0.5-6
SDZ	1.36±0.05	-0.36±0.07	-0.9393	2.5	4-20
SG	-0.30±0.03	0.28±0.04	0.96848	0.9	1.1-20

Примечание. Отрицательные значения Δi соответствуют увеличению, положительные - снижению сигнала ДНК-пероксидазного сенсора

Применение термически денатурированной ДНК в составе биосенсора можно рекомендовать для определения суммарного количества сульфаниламидов, тогда как нативная ДНК дает возможность селективного определения SMX. В последнем случае измерение сигнала МЗ позволяет отделить возможное влияние на сигнал субстратов пероксидазы, не взаимодействующих с ДНК.

Ингибирование сигнала МС сульфаниламидами может быть связано с конкурентным вытеснением маркера с поверхности ДНК, где сульфаниламиды занимают по данным микрокалориметрических исследований те же центры свя-

зывания, что и МС. При этом снижается поверхностная концентрация МС и его активность в электрохимических и биохимических реакциях. Изменение сигнала МЗ обусловлено скорее влиянием сульфаниламидов на электростатические взаимодействия в поверхностном слое.

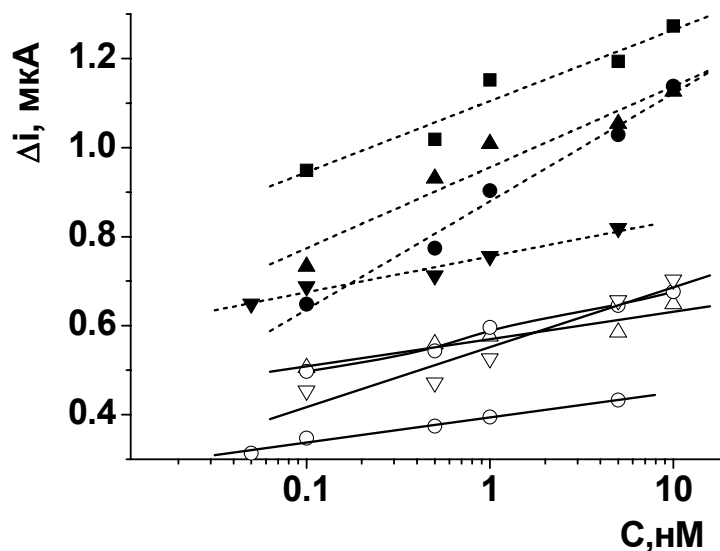


Рисунок 2. Определение сульфаниламидных препаратов с помощью ДНК-пероксидазного сенсора на основе нативной и денатурированной ДНК. Инкубирование 10 мин. МС 4.0 мкМ, H₂O₂ 1.0 мМ; денДНК - ▼ - SMZ, ▲ - SMX, ● - SDZ, ■ - SG, нативная ДНК - ∇ - SMZ, △ - SMX, ○ - SDZ, □ - SG

С увеличением времени контакта или концентрации сульфаниамида смещается равновесие взаимодействия (интеркалирования) МС и ДНК. Снижение поверхностной концентрации маркера частично компенсируется высвобождением его малоактивной интеркалированной формы, что приводит к снижению ингибирующего действия сульфаниамида и повышению скорости биокаталитического превращения МС. Изменение концентрации и доступности маркера на поверхности сенсора и, как следствие, варьирование его сигнала зависят от специфичности связывания сульфаниламидов и подвижности равновесий перехода различных форм маркера. Денатурация ДНК исключает интеркалирование МС и, в то же время, увеличивает концентрацию центров связывания маркера, поэтому различие в поведении МС и МЗ, наблюдаемое в присутствии нативной ДНК, на электродах, модифицированных денатурированной ДНК, нивелируется.

Цефтазидим оказывает активирующее и ингибирующее действие на сигнал ДНК-пероксидазного сенсора в зависимости от диапазона концентраций и продолжительности инкубирования (рис.3). В отличие от сульфаниламидов,

влияние цефтазида слабо зависит от концентрации маркера и закономерно снижается с увеличением продолжительности инкубирования до 60 мин. В присутствии МС на градуировочной зависимости видны два линейных участка, отвечающих конкурентному вытеснению маркера из спирали и его последующей десорбции. Сигнал МЗ во всем диапазоне концентраций цефтазида снижается по сравнению с контрольным измерением.

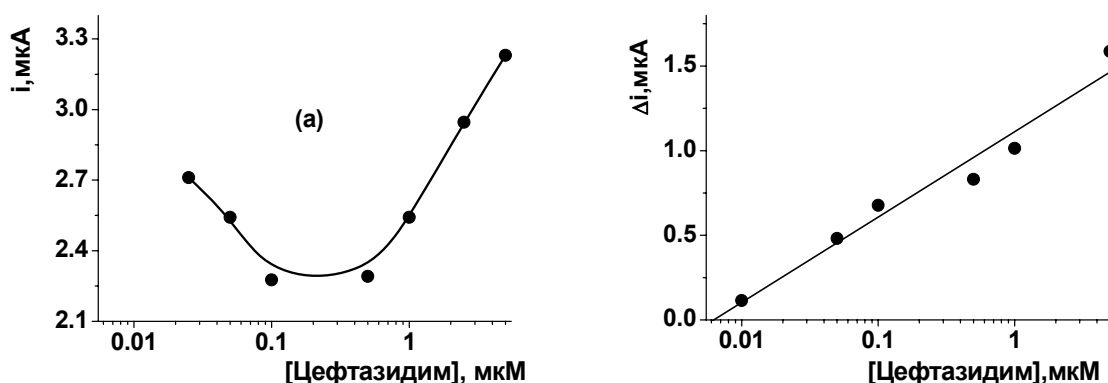


Рисунок 3. Определение цефтазида с помощью ДНК-пероксидазного сенсора. (а) маркер 10 мкМ МС; (б) маркер 60 мкМ МЗ. Фосфатный буферный раствор, H_2O_2 1.0 мкМ

Антрациклиновые препараты. Рубомицин и доксорубин относятся к противораковым препаратам, действие которых связано с их способностью встраиваться (интеркалировать) в спираль двунитевой ДНК. Они вытесняют МС из спирали ДНК, что приводит к увеличению его сигнала с максимумом при продолжительности инкубирования 10 мин. (рис.4).

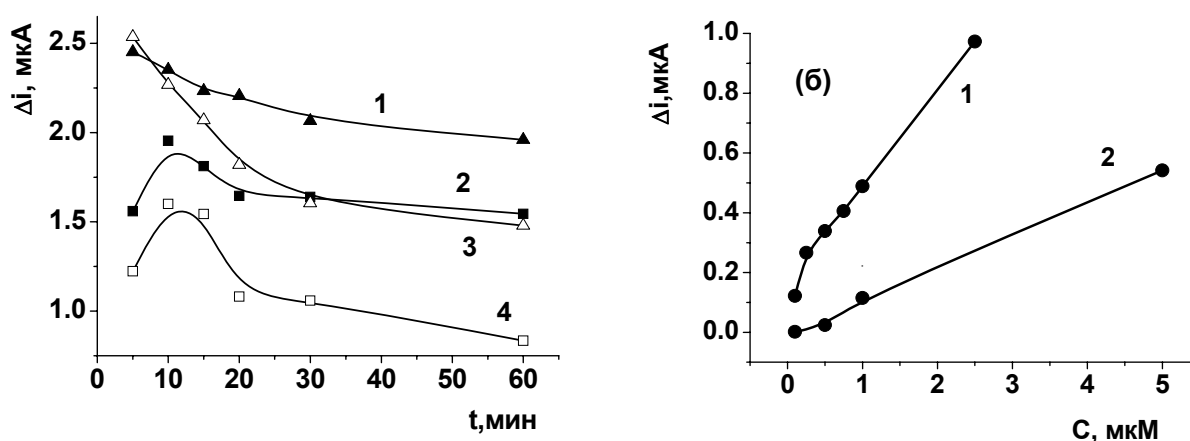


Рисунок 4. Определение рубомицина и доксорубина с помощью ДНК-пероксидазного сенсора: (а) влияние продолжительности инкубирования, 1 - 0.5 мкМ доксорубин, МС, 2 - 0.05 мкМ доксорубин, МС, 3 - 0.5 мкМ доксорубин, МЗ, 4 - 0.05 мкМ доксорубин, МЗ. (б) Определение доксорубина (1) и рубомицина (2), МС

В дальнейшем сигнал снова уменьшается, по-видимому, в результате десорбции части маркера с поверхности сенсора. Сами изученные антрациклины в рабочих условиях измерения сигнала электрохимически неактивны и не являются субстратами или эффекторами пероксидазы.

Промазин. Хотя промазин относится к числу субстратов пероксидазы, эффективность его прямого биокаталитического превращения оказалась невысокой. В присутствии ДНК в поверхностном слое при добавлении маркеров генерируется биокаталитический ток окисления промазина, величина которого зависит от концентрации промазина и маркера (рис.5). Вероятно, МС и МЗ участвуют в пероксидазном окислении промазина как медиаторы электронного переноса с субстрата на электрод, а ДНК играет роль селективного сорбента, увеличивая эффективную концентрацию медиатора в поверхностном слое.

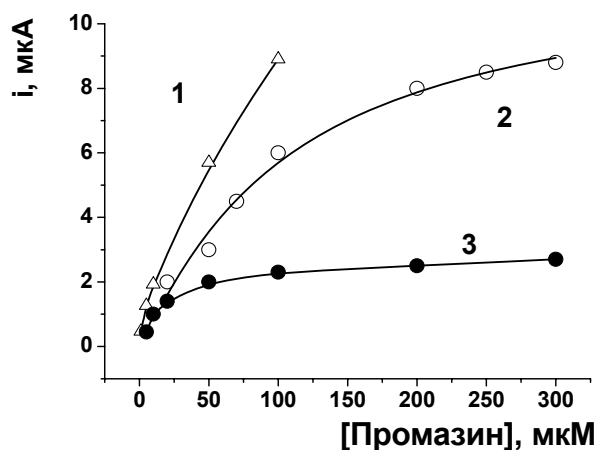


Рисунок 5. Определение промазина как субстрата пероксидазы. 1 – денДНК-пероксидазный сенсор, 2 - ДНК- пероксидазный сенсор, 3 – пероксидазный сенсор. МС 10 мкМ, H_2O_2 1.0 мМ. Фосфатный буферный раствор 7.0.

Этидиум бромид. Хотя данный препарат относится к интеркаляторам ДНК, его влияние на сигнал ДНК-пероксидазного сенсора аналогично действию сульфаниламидов и цефтазидима. В области малых концентраций этидиум бромид снижает сигнал ДНК-сенсора, по-видимому, за счет блокирования свободных центров ДНК. При более высоких концентрациях и продолжительности инкубирования более 20 мин. ингибирование снижается вплоть до исходного значения сигнала в отсутствие препарата. В отличие от рубомицина и доксорубицина, стационарное состояние на поверхности сенсора устанавливается медленно, сигнал ДНК-сенсора меняется в течение 40-60 мин. с максимумом при 10 мин. С увеличением времени контакта начинает сказываться более медленный процесс включения препарата в спираль ДНК и вытеснение из нее маркера.

Аналитические характеристики определения цефтазидима, рубомицина, доксорубицина и этидиум бромиды приведены в табл.3.

Таблица 3. Аналитические характеристики определения цефтазидима, промазина, рубомицина, доксорубицина и этидиум бромиды с помощью ДНК-пероксидазного сенсора. Инкубирование 10 мин.

$$\Delta i, \text{ мкА} = a + b \times \lg(C, \text{ мкМ})$$

Препарат	a	b	R	C _{lim}	Интервал опр-х конц-й, C, мкМ
Цефтазидим ^{а)}	1.11±0.05	0.50±0.05	0.9811	0.01	0.05-10
Промазин ^{а)}	-6.91±1.05	6.36±0.51	0.9838	20	50-300
Этидиум бромид ^{б)}	0.10±0.17	0.62±0.07	0.9770	0.0001	0.5-10

$$\Delta i, \text{ мкА} = a + b \times (C, \text{ мкМ})$$

Рубомицин ^{б)}	-0.01±0.01	-0.11±0.005	-0.9983	0.1	0.5-5
Доксорубицин ^{б)}	0.15±0.02	-0.33±0.02	-0.9936	0.01	0.6-25

Примечание. а) Маркер МЗ; (б) Маркер МС. Отрицательные значения Δi соответствуют увеличению, положительные - снижению сигнала ДНК-пероксидазного сенсора

Определение загрязняющих веществ и ДНК-повреждающих факторов

Биосенсор инкубировали в растворе токсикантов и далее измеряли сигнал маркера в присутствии 1.0 мМ H₂O₂. В отличие от действия лекарственных препаратов, изменение сигнала биосенсора после контакта с растворами загрязняющих веществ носило в основном необратимый характер. По результатам тестирования и механизму действия все вещества можно разделить на три группы:

- неспецифические инактиваторы (ацетон, неионогенные поверхностно-активные вещества); их действие проявляется в снижении сигнала, пропорциональном времени контакта независимо от природы маркера; изменение сигнала маркера выше при рН, отличающихся от оптимума пероксидазной реакции, т.е. при меньшей скорости их биохимического окисления;

- субстраты и эффекторы пероксидазы (ароматические амины и спирты, ионы металлов). Их действие проявляется в снижении влияния ДНК на сигнал биосенсора. Изменение сигнала различных маркеров становится ближе друг к другу, что выражается в относительном уменьшении сигнала МС и увеличении сигнала МЗ по сравнению с контрольным экспериментом до инкубирования биосенсора. Ингибирующее действие эффекторов пероксидазы в присутствии

ДНК проявляется слабее, чем на нативный или иммобилизованный фермент. Действующие концентрации ионов меди (II) составили 1-10 мг/л, ионы ртути (II) в условиях эксперимента на сигнал ДНК-пероксидазного сенсора не влияли.

- интеркаляторы ДНК (малополярные полиароматические соединения) вызывают обратимое незначительное увеличение сигнала МС и МЗ аналогично действию рубомицина и доксорубицина.

Результаты тестирования некоторых модельных загрязнителей с помощью ДНК-пероксидазного сенсора приведены на рис.6.

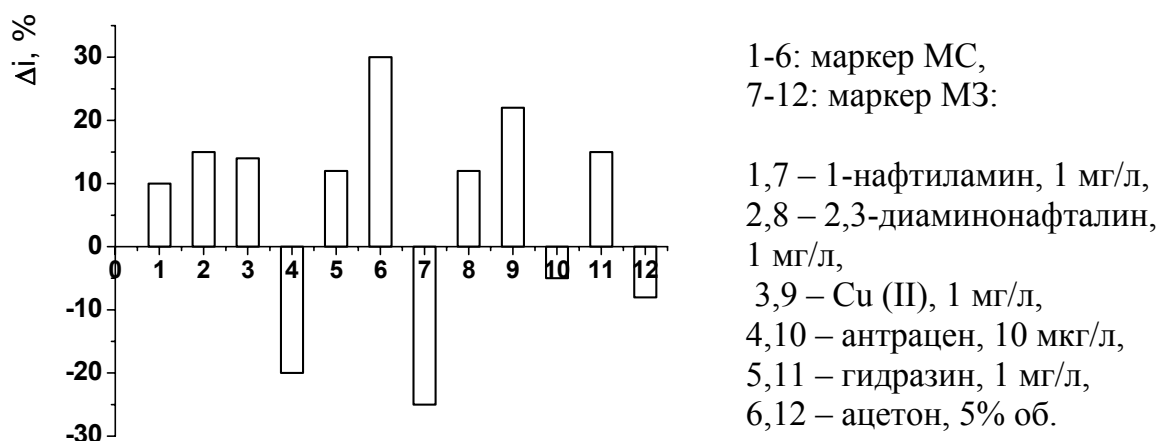


Рисунок 6. Изменение сигнала ДНК-пероксидазного сенсора после его инкубирования в растворе загрязняющих веществ. Отрицательные значения Δi соответствуют увеличению, положительные - снижению сигнала. Инкубирование 10 мин, МС 10 мкМ, МЗ 60 мкМ, H_2O_2 1.0 мМ

Наибольшее влияние на сигнал ДНК-пероксидазного сенсора оказывают аимнопроизводные нафталина и гидразин, действие которых проявляется в микромолярном диапазоне концентраций (рис.7). В присутствии ионов меди (II) вместо ингибирования наблюдается увеличение сигнала, которое зависит от природы органического компонента и соотношения концентраций эффекторов. Вероятно, синергирующее действие можно объяснить образованием органических комплексов меди (II), участвующих в генерировании свободных радикалов в реакции с пероксидом водорода. При этом увеличивается концентрация центров связывания маркера и сигнал биосенсора. С увеличением концентрации металла начинает превалировать его ингибирующее действие на фермент.

Результаты определения некоторых загрязняющих веществ приведены в табл.4.

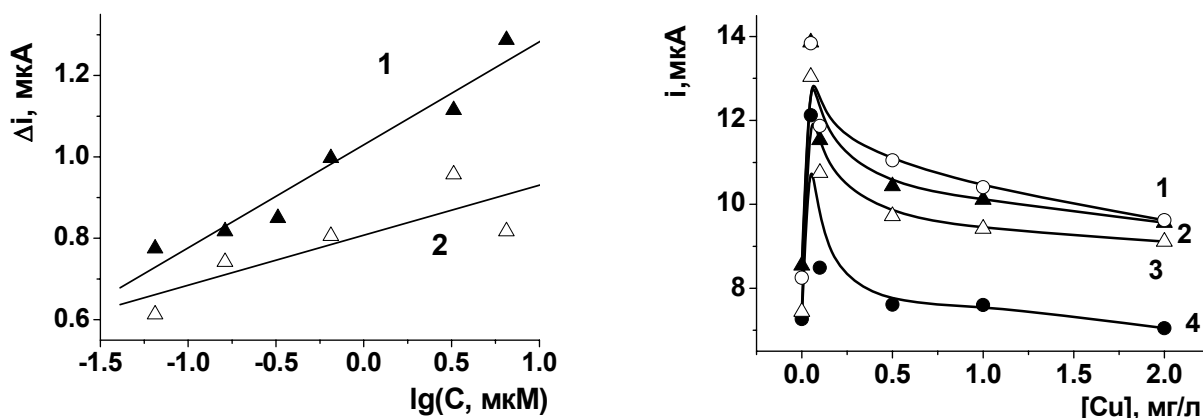
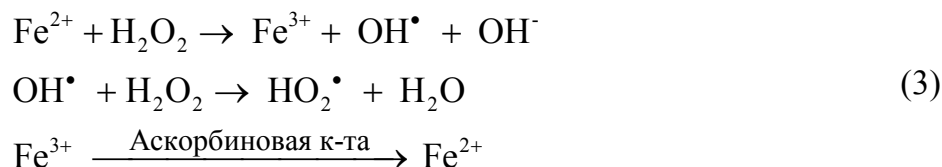


Рисунок 7. (а) Определение 2,4-диаминонафталина, маркер МС (1) и МЗ (2), инкубирование 10 мин. (б) Совместное действие ионов Cu^{2+} и гидразина на сигнал 10 μM МС: 1 – 1 mg/l , 2 – 0.5 mg/l , 3 – 0.1 mg/l , 4 – 0.05 mg/l

Таблица 4. Аналитические характеристики определения некоторых загрязняющих веществ с помощью ДНК-пероксидазного сенсора. Инкубирование 10 мин.

Загрязнитель	$\Delta i, \mu\text{A} = a + b \times \lg(C, \mu\text{M})$			$C_{\text{lim}}, \mu\text{M}$	Интервал определяемых концентраций, C, nM
	a	b	R		
2,3-диаминонафталин	1.03 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.9738	0.1	0.5-40
1-нафтиламин	2.54 ± 0.18	0.26 ± 0.03	0.9738	0.07	0.1-10
ПЭГ-1500 (C,%)	1.10 ± 0.24	0.09 ± 0.004	0.9855	0.0001%	0.001-0.1%

Помимо индивидуальных соединений – загрязнителей окружающей среды нами было изучено действие гидроксильных и супероксидных радикалов, генерируемых в системе пероксид водорода - железо (II) - аскорбиновая кислота (3).



Генерирование гидроксидных и супероксидных радикалов проводили в нейтральной и слабощелочной среде, для повышения гидролитической устойчивости ионов Fe^{2+} в раствор добавляли ЭДТА. Реакция (3) инициирует радикальное окисление гуаниновых оснований и сахаридных фрагментов ДНК. Сигнал ДНК-пероксидазного сенсора увеличивается в 2-4 раза за счет появления дефек-

тов спирали ДНК и снижения эффективности интеркаляции маркера. Стационарное состояние достигается после инкубирования в течение 6-12 минут. Лимитирующим фактором, определяющим повреждение ДНК, является концентрация пероксида водорода.

Чтобы выделить участие аскорбиновой кислоты в реакции пероксидазного и неферментативного окисления в присутствии пероксида водорода, провели сравнение стационарных откликов ДНК-пероксидазного сенсора при его инкубировании в реактиве Фентона, содержащем и не содержащем аскорбиновую кислоту (рис.8).

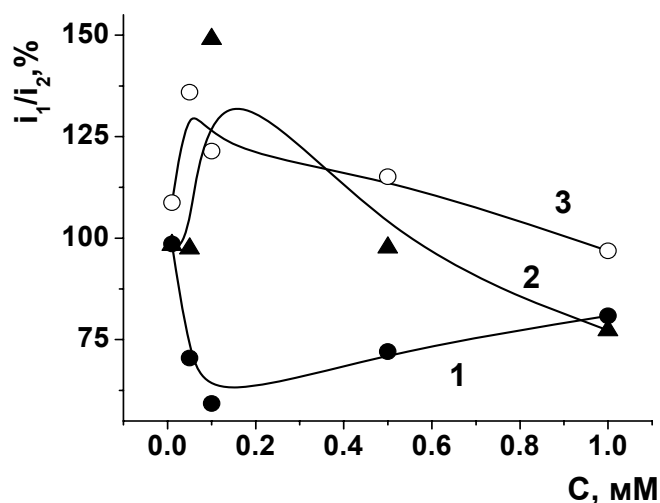


Рисунок 8. Влияние антиоксидантов на повреждающее действие реактива Фентона на ДНК. 1 – аскорбиновая кислота, 2 – рутин, 3- глутат-ион

До концентрации 0.1 мМ аскорбиновая кислота снижает действие ДНК-повреждающего фактора, что выражается в относительном уменьшении сигнала маркера. При более высокой концентрации отношение токов увеличивается, возможно, в результате ее участия в химическом восстановлении окисленной формы маркера. Напротив, рутин и глутат-ион в малых концентрациях, по-видимому, более эффективно реагируют с МС в растворе и лишь при более высоких концентрациях включаются в реакции с участием радикальных частиц.

ВЫВОДЫ

1. Модификация стеклоуглеродных электродов нативной и денатурированной ДНК и пероксидазой повышает чувствительность электрохимического определения метиленового синего и метиленового зеленого за счет их селективного накопления в результате координации в области малых бороздок и в спирали ДНК.

3. Сульфаниламидные препараты и цефтазидим в наномолярном диапазоне концентраций снижают сигнал ДНК-пероксидазного сенсора, вытесняя метиленовый синий с поверхности спирали ДНК. При увеличении продолжительности инкубирования или концентрации сульфаниламида снижение концентрации активной формы маркера компенсируется высвобождением интеркалированной формы маркера. Сопоставление сигнала, полученного при использовании двух маркеров - метиленового синего и метиленового зеленого, - позволяет выделить вклад в сигнал биосенсора субстратов и эффекторов пероксидазы, не реагирующих с ДНК.
4. Антрациклиновые препараты (рубомидин и доксорубин) и этидиум бромид повышают сигнал биосенсора за счет вытеснения интеркалированной формы маркера и увеличения его доступности для пероксидазного окисления.
5. Термическая денатурация ДНК увеличивает сигнал ДНК-пероксидазного сенсора за счет исключения интеркалирования метиленового синего и повышения концентрации центров связывания на поверхности электрода для метиленового синего и метиленового зеленого, что приводит к уменьшению различий в поведении маркеров и повышению чувствительности определения сульфаниламидных препаратов. Из-за меньшей воспроизводимости сигнала для малых концентраций метиленового синего определяемые концентрации сульфаниламидов выше, чем при использовании в составе биосенсора нативной ДНК.
6. Инкубирование ДНК-пероксидазного сенсора в растворе загрязнителей окружающей среды - ароматических аминов и спиртов, ацетона, ионов металлов, - приводит к подавлению влияния ДНК на сигнал пероксидазного окисления маркеров и к ингибированию фермента. При совместном присутствии ионов меди (II) и аминов наблюдается увеличение сигнала в области малых концентраций металла в силу радикального окисления ДНК и его снижение при более высоких концентрациях в результате ингибирования фермента.
7. Генерирование гидроксильных радикалов по реакции Фентона увеличивает сигнал метиленового синего за счет частичного нарушения структуры ДНК. Это приводит к увеличению сигнала ДНК-пероксидазного сенсора. Антиоксиданты (аскорбиновая кислота, рутин, глутат-ион) в зависимости от природы и концентрации могут оказывать защитное действие, снижая сигнал биосенсора, и участвовать в регенерации маркера, увеличивая сигнал ДНК-пероксидазного сенсора, что можно применить в оценке их антиоксидантной активности.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Evtugyn G.A. Development of electrochemical biosensors for the sensitive detection of specific DNA interactions [Text] / G.A.Evtugyn, O.E.Goldfarb, H.C.Budnikov, V.G.Vinter // Euroanalysis-12. Dortmund, 2002. Book of Abstracts.- 2002.- P. 90.

2. Стойкова Е.Е. ДНК-сенсоры с электрохимически активными индикаторами – производными феноптиазина [Текст] / Е.Е.Стойкова, О.Э.Гольдфарб, С.В. Белякова, Г.А.Евтюгин, Г.К.Будников // Вестник ТО РЭА.- 2003.- №3.- С.51-55.
3. Супрун Е.В. Пероксидазные сенсоры на основе модифицированных графитовых материалов [Текст] / Е.В.Супрун, О.Э.Гольдфарб, С.В.Белякова, Р.Р.Габсабировова // Тезисы III научн. конф. мол. ученых, аспирантов и студентов НОЦ КГУ "Материалы и технологии XXI века". Казань, 2003- .
4. 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.Porfirjeva, V.G.Vinter // 17 International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics. Florence, Italy, June 19-24, 2003.- P.198.
5. Evtugyn G.A. Amperometric DNA sensors with enzymatic amplification of the signal [Text] / G.A. Evtugyn, O.E. Goldfarb, T.I. Abdullin, H.C. Budnikov, V.G. Vinter // Workshop on "New trends in nucleic acid based biosensors" Firenze, 25-28 Oct. 2003, Book of Abstracts.- 2003.- P.25.
6. Будников Г.К. Определение лекарственных препаратов с помощью ДНК-сенсоров с ферментативным усилением сигнала [Текст] / Г.К.Будников, Г.А. Евтюгин, О.Э. Гольдфарб, В.Г. Винтер // II Всерос. Симпозиум "Тест-методы анализа". 21-25 июня 2004 г. Тез.докл.- Саратов: "Научная книга", 2004.- С.7.
7. Будников Г.К. Электрохимические ДНК-сенсоры [Текст] / Г.К.Будников, Г.А. Евтюгин, О.Э.Гольдфарб, С.В.Белякова, Т.И.Абдуллин, В.Г.Винтер // "ЭМА-2004" VI Всерос. конф. по электрохимическим методам анализа. г. Уфа.- 2004.- С.266-267.
8. Будников Г.К. Амперометрические ДНК-сенсоры на основе модифицированных графитовых электродов [Текст] / Г.К.Будников, Г.А.Евтюгин, О.Э. Гольдфарб // Научно-технологические - 2004.- Т.5, №4.- С.30-37.
9. Будников Г.К. Амперометрические ДНК-сенсоры с ферментативным усилением сигнала [Текст] / Г.К.Будников, Г.А.Евтюгин, О.Э.Гольдфарб // "Электроаналитика - 2005" Всерос. научн.конф. с межд.участием. Екатеринбург, 2005 г. Тез. докл.- 2005.- С.15.
10. Evtugyn G.A. Amperometric DNA-peroxidase sensor for the detection of pharmaceutical preparations [Text] / G.A.Evtugyn, O.E.Goldfarb, H.C.Budnikov, A.N. Ivanov, V.G.Vinter // Sensors.- 2005.- V.5, №6.- P.317-323.