

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ОПТИЧЕСКИХ ДНК-СЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

Солдатова Л.С.- аспирант, Бессонова О.В. – к. т.н.,
Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Омский государственный аграрный университет» (г. Омск)

Цель работы: Разработка технологии оптических ДНК-сенсоров на основе наночастиц оксида железа для определения лекарственных препаратов.

Актуальность

Разработка экспрессных, точных и чувствительных вариантов определения биологически активных соединений - одна из актуальных задач современной аналитической химии. Исследования в этой области стимулируются потребностями медицины, пищевой промышленности, ветеринарии, необходимостью мониторинга окружающей среды (http://www.researchandmarkets.com/reports/567119/world_biosensors_markets_2007.pdf).

Определение лекарственных препаратов представляет как практический, так и теоретический интерес для изучения их свойств, содержания в сыворотке крови и других матриксах, влияния на организм человека и животных, фармакокинетики, структуры синтезированных соединений и биохимических реакций с их участием. Лекарственные препараты, как и многие физиологически активные вещества, способны оказывать положительное или отрицательное воздействие на организм в зависимости от дозы и длительности воздействия. Кроме того, в связи с широким применением высокоэффективных биологически активных соединений в других областях жизнедеятельности (например, в сельском хозяйстве) в воде и пищевых продуктах могут содержаться остатки этих препаратов в количествах, превышающих безопасный уровень [1]. В связи с требованиями повышения качества жизни и увеличением поступлений фальсифицированной продукции на фармацевтический рынок, в последнее время необходимы разнообразные варианты количественного определения широкого круга лекарственных препаратов для оценки их качества, а также для определения их содержания в организме человека и животных.

Весьма перспективными в этом отношении являются био- и иммуносенсоры, обладающие преимуществом on-site тестирования и позволяющие одновременно анализировать

большое количество образцов [2]. Интерес к биосенсорным методам анализа связан еще и с возможностью относительно простого варьирования селективности определений по отношению к ряду соединений. Несмотря на существующие варианты био- и иммуносенсорного анализа, разнообразие объектов исследования, усложнение аналитических задач требуют дальнейшего усовершенствования подходов к разработке вариантов анализа и схем био- и иммуносенсорных методов.

Под термином «биосенсор» следует понимать устройство, в котором чувствительный слой, содержащий биологический материал: ферменты, ткани, бактерии, дрожжи, антигены / антитела, липосомы, органеллы, рецепторы, ДНК, непосредственно реагирующий на присутствие определяемого компонента, генерирует сигнал, функционально связанный с концентрацией этого компонента. Конструктивно биосенсор представляет собой комбинированное устройство, состоящее из двух преобразователей, или трансдьюсеров, - биохимического и физического, находящихся в тесном контакте друг с другом. Биохимический преобразователь выполняет функцию биологического элемента распознавания, преобразуя определяемый компонент, а точнее, информацию о химических связях в физическое или химическое свойство или сигнал, а физический преобразователь это свойство фиксирует с помощью специальной аппаратуры. Наличие в устройстве биоматериала с уникальными свойствами позволяет с высокой селективностью определять нужные соединения в сложной по составу смеси, не прибегая ни к каким дополнительным операциям, связанным с использованием других реагентов, концентрированием и т.д. [3].

Существует большое разнообразие физических трансдьюсеров: электрохимические, спектроскопические, термические, пьезоэлектрические, оптические и т.д. В настоящее время наибольшее распространение получили электрохимические преобразователи, сре-

ди которых выделяют амперометрические, потенциометрические и кондуктометрические.

Несмотря на большое научное и практическое значение исследований ДНК-сенсоров для определения лекарственных препаратов, работы, посвященные этому вопросу, немногочисленны, главным образом, из-за серьезных трудностей, обусловленных спецификой физических преобразователей.

Характеристика аналогов

На данный момент известно множество подходов к конструированию амперометрических биосенсоров. Наиболее распространенные ферментативные метки, использующиеся в биосенсорном анализе при окислении субстрата в присутствии H_2O_2 , – это пероксидаза хрена [4] и щелочная фосфатаза [5], катализирующая реакцию дефосфорилирования различных органических фосфатов, продукт которой определяется амперометрическим методом. Портативная амперометрическая иммуносенсорная система разработана для определения бактерий *Escherichia coli* с использованием антител, маркированных пероксидазой хрена. Чувствительность сенсора позволяет определять наличие бактерий с концентрацией 50 клеток/мл за 22 минуты. Сенсор представляет собой мембрану, состоящую из проводящей сетки углеродных волокон, на которой иммобилизованы антитела, специфичные к антигену. При пропускании через иммунофильтрационную сетку бактерии связываются с модифицированными на ней антителами. Для выработки аналитического сигнала связавшиеся клетки маркируются специфичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Данная схема реализации иммунохимического анализа называется слоистой (*sandwich-scheme*).

Слоистая схема неконкурентного анализа реализована в амперометрическом иммуносенсорном сенсоре на IgG кролика, маркирование которого производилось с помощью анти-IgG, конъюгированного с щелочной фосфатазой. Субстратом для метки в данном случае является дигидрохинон дифосфата, который окисляется до гидрохинона с высвобождением двух электронов. Предел обнаружения сенсора составляет 8 нг/мл при времени инкубации меченого иммуноглобулина кролика порядка одного часа.

Амперометрический иммуносенсор на низкомолекулярное вещество кокаин был представлен А. Сулейманом [6], электроактивным маркером в нем является пероксидаза хрена, конъюгированная с антителами на

бензоилэконин (часть молекулы кокаина), иммобилизованная на мембране, прикрепленной к O_2 -электроду. В процессе анализа гаптен с предельно низкой концентрацией 10^{-7} М/л ингибирует ферментативную реакцию окисления субстрата за счет создания стерических препятствий для проникновения субстрата к активным центрам фермента.

Описано применение потенциометрического сенсора для определения человеческого IgG с использованием асимметричной ионоселективной мембраны с иммобилизованными аденозиндезаминазой и IgG. Антитела с конъюгированной щелочной фосфатазой связываются с иммобилизованным IgG, создавая биферментный каталитический слой. В присутствии анализируемого белка конъюгат в соответствии с конкурентным принципом не связывается с мембраной, уменьшая тем самым скорость диффузии продуктов ферментативных реакций.

Представляется также интересным разработанный Сансбергом и др. [7] анализатор на гербицид атразин. В качестве подложки для иммобилизации антител выбран проводящий полимер, допированный ионами I^- . Гербицид, связанный глюкозооксидазой, в процессе анализа контактирует с активными центрами антител на полимерной матрице. Резистивная система считывания начинает функционировать, когда в буферный раствор вводится глюкоза и лактопероксидаза. При окислении глюкозы вырабатывается пероксид водорода, используемый другим ферментом для изменения свойств допирующей примеси от I^- к I_3^- , отвечающей за качество проводимости полимера. Пороговая чувствительность сенсора составляет 25 нг/л, а время, необходимое для анализа, – 15 минут.

Основной задачей настоящих исследований является повышение чувствительности ДНК-сенсоров для определения лекарственных препаратов.

Новизна

Новизна проекта заключается в разработке оптических ДНК-сенсоров, отличающихся рядом конкурентных преимуществ перед современными аналогами:

- нетрудоемкая и экономически эффективная технология изготовления сенсоров;
- высокая чувствительность определения;
- малое время отклика;
- компактность за счет использования достижений нанотехнологии, удобство применения;

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ОПТИЧЕСКИХ ДНК-СЕНСОРОВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

- высокая операционная стабильность и стабильность при хранении.

Постановка задачи

Цель работы - разработка технологии оптических ДНК-сенсоров на основе наночастиц оксида железа для определения лекарственных препаратов.

В ходе исследования решались следующие задачи:

- определение условий взаимодействия сульфаниламидных маркеров с компонентами биочувствительного компонента (ДНК и цитохромоксидаза), необходимых для регенерации активной формы индикатора и регистрации аффинных взаимодействий с участием ДНК на поверхности сенсора;
- выбор оптимальных условий иммобилизации цитохромоксидазы и нативной ДНК, обеспечивающих воспроизводимый сигнал сенсора и высокую чувствительность определения лекарственных препаратов;
- изучение механизма взаимодействия сульфаниламидных маркеров и лекарственных препаратов с ДНК;
- разработка высокочувствительных методов определения лекарственных препаратов и способов повышения селективности отклика сенсора.

Методы исследования

Теоретические и экспериментальные исследования предполагается вести с учетом всех этапов современной методологии исследования сложных явлений с помощью новейших методов биохимического, физико-химического, структурно-механического анализа, а также методов компьютерной, экспериментальной химии и информационных технологий с применением последних достижений науки и техники.

При выполнении работ планируется использовать следующие научно-технические подходы:

- пьезокварцевое микровзвешивание;
- спектроскопия в УФ-, видимой- и ИК-диапазонах;
- флуориметрия и фосфориметрия;
- термогравиметрия;
- регистрация изотерм поверхностное давление – площадь, приходящаяся на молекулу в монослое;
- эллипсометрия;
- атомно-силовая микроскопия;
- масс-спектрометрия;
- жидкостная хроматография;
- иммуно-химические методы анализа.

Полученные результаты

ПОЛЗУНОВСКИЙ АЛЬМАНАХ № 4/2 2011

В ходе исследования получены следующие результаты:

- были определены условия взаимодействия взаимодействия сульфаниламидных маркеров с компонентами биочувствительного компонента (ДНК и цитохромоксидаза), необходимые для регенерации активной формы индикатора и регистрации аффинных взаимодействий с участием ДНК на поверхности сенсора;

- выбраны оптимальные условия иммобилизации цитохромоксидазы и нативной ДНК, обеспечивающие воспроизводимый сигнал сенсора и высокую чувствительность определения лекарственных препаратов.

Установлено, что такие сульфаниламидные препараты, как стрептоцид, фталазол и норсульфазол влияют на сигнал ДНК-сенсора в зависимости от природы маркера и условий взаимодействия с биосенсором. Показано, что посторонние примеси (ароматические амины, спирты, ионы тяжелых металлов) приводят к подавлению влияния ДНК на сигнал биосенсора.

Экономическая эффективность

В настоящее время предложен ряд технических решений для количественного биосенсорного определения таких лекарственных препаратов, как антрациклиновые препараты, фенотиазины, сульфаниламиды. Предлагаемые в данном проекте биосенсоры отличаются рядом конкурентных преимуществ перед современными аналогами:

- нетрудоемкая и экономически эффективная технология изготовления сенсоров;
- высокая чувствительность определения;
- малое время отклика;
- компактность за счет использования достижений нанотехнологии, удобство применения;
- высокая операционная стабильность и стабильность при хранении.

План коммерциализации полученных результатов

Для успешного завершения проекта и выхода продукции на рынок необходимо осуществление следующих операций:

- изучение механизма взаимодействия сульфаниламидных маркеров и лекарственных препаратов с ДНК;
- разработка высокочувствительных методов определения лекарственных препаратов и способов повышения селективности отклика сенсора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евтюгин, Г.А. Электрохимические ДНК-сенсоры для определения биологически активных низкомолекулярных соединений / Евтюгин, Г.К. Будников, А.В.Порфирьева // Российский химический журнал.- 2008.- Т. LII.- № 2.- С. 66-79.
 2. Штыков, С.Н. Наноматериалы и нанотехнологии в химических и биохимических сенсорах: возможности и области применения / С.Н. Штыков, Т.Ю. Русанова // Российский химический журнал.- 2008.- Т. LII.- С. 92-100.
 3. Будников, Г.К. Биосенсоры как новый тип аналитических устройств / Г.К. Будников // Соросовский образовательный журнал.- 1996.- №12.- С. 26-32.
 4. Carnes, E. The Development of A New, Rapid, Amperometric Immunosensor for the Detection of Low Concentrations of Bacteria Part I: Design of the Detection System and Applications / E. Carnes, E. Wilkins. // American Journal of Applied Sciences.- 2005.- Vol. 2.-№3.- P. 597-606.
 5. Wilson, M.S. Novel amperometric immunosensors based on iridium oxide matrices / M.S. Wilson, R.D. Rauh. // Biosensors and Bioelectronics.- 2004.- Vol. 19.- P. 693-699.
 6. Suleiman, A.A. An Amperometric immunosensor for cocaine / A.A. Suleiman, Y. Xu. // Electroanalysis.- 1998.- Vol.10.- №4.- P. 240-243.
 7. Sandberg, R.G. A conductive polymer-based immunosensor for the analysis of pesticide residues / R.G. Sandberg, L.J. Van-Houten, J.L. Schwartz // ACS Symposium Series 511, Washington D.C.- 1992.- P. 81-88.
- СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМАТИКЕ РАБОТЫ
1. Солдатова, Л.С. Особенности получения нанокompозитных материалов для иммобилизации и фракционирования биологических веществ в молекулярной биологии, генной инженерии и пищевой промышленности / Л.С. Солдатова, О.О. Бабич, О.А. Гладилова // Роснанотех-2009: сб. науч. работ.- Москва, 2009.- С. 810-811.
 2. Солдатова, Л.С. Способ модификации наночастиц Fe_3O_4 для выделения биологических веществ / Л.С. Солдатова, О.О. Бабич // Проведение научных исследований в области индустрии наносистем и материалов: сб. науч. работ.- Белгород, 2009.- С. 73-76.
 3. Солдатова, Л.С. Повышение каталитической активности и стабильности химотрипсина за счет ковалентной иммобилизации на магнитных наночастицах Fe_3O_4 / Л.С. Солдатова, О.А. Гладилова // Техника и технология пищевых производств.- 2010.- №1.- С. 69-72.
 4. Солдатова, Л.С. Безреагентный нанобиосенсор для количественного определения глюкозы на основе частиц Fe_3O_4 и глюкозооксидазы / Л.С. Солдатова // Биотехнология: состояние и перспективы развития: сб. науч. работ.- Москва, 2011.- С. 219-220.
 5. Солдатова, Л.С. Электрохимический биосенсор глюкозы на основе глюкозооксидазы, иммобилизованной на наноматериале / Л.С. Солдатова, О.А. Гладилова // Вестник ВСГТУ.- 2011.- №2 (33).- С. 5-11.
 6. Солдатова, Л.С. Сравнительная оценка адсорбционного и глутаральдегидного методов иммобилизации L-фенилаланин-аммоний лиазы на частицах Fe_3O_4 / Л.С. Солдатова, О.А. Гладилова, О.О. Бабич // Фундаментальные исследования.- 2011.- №8.- С. 672-677.