

УДК 543.558+544.636/.638

**ИМПЕДИМЕТРИЧЕСКИЙ ДНК-СЕНСОР
НА ОСНОВЕ ЭЛЕКТРОДОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ
УГЛЕРОДНЫМИ НАНОТРУБКАМИ, ПОЛИ(МЕТИЛЕНОВЫМ
СИНИМ) И АПТАМЕРОМ НА ТРОМБИН**

А.В. Порфирьева, Г.А. Евтюгин, М.А. Савельева, Г.К. Будников

Аннотация

Предложены импедиметрические сенсоры на основе электродов, модифицированных углеродными нанотрубками и поли(метиленовым синим). Показано, что присутствие полифенотиазина способствует адсорбции аптамера и улучшает аналитические характеристики определения тромбина за счет электростатических взаимодействий противоположно заряженных компонентов покрытия и стерических ограничений взаимодействия аптамера и тромбина. ДНК-сенсоры позволяют проводить определение 10^{-9} – 10^{-6} М тромбина.

Ключевые слова: ДНК-сенсор, аптасенсор, биосенсор, измерение электрохимического импеданса, электрополимеризация, определение тромбина.

Введение

В последние годы большое внимание уделяется развитию средств диагностики ДНК и установления ДНК-повреждающих факторов [1]. Интерес к подобной тематике обусловлен как потребностью в фундаментальных знаниях в области функционирования ДНК и передачи генетической информации, так и прикладными задачами создания средств медицинской диагностики онкологических заболеваний и установления онкогенов. Существуют различные подходы к созданию ДНК-сенсоров, включающие контроль оптических свойств ДНК [2], изучение биоаффинных процессов с ее участием (гибридизационные взаимодействия, связывание специфических белков) с помощью масс-чувствительных детекторов [3–5], электрохимические методы анализа [6–10]. Последние выгодно отличаются от оптических и масс-чувствительных методов более простой конструкцией сенсорной и измерительной частей оборудования, совместимостью с серийно выпускаемым оборудованием и возможностью варьирования условий взаимодействия ДНК и определяемого вещества на поверхности сенсора путем организации поверхностного слоя с участием дополнительных компонентов. Использование в составе ДНК-сенсоров полиэлектролитных комплексов позволяет имитировать процессы, протекающие в живой клетке на стадиях транспорта компонентов через биологические мембраны. При этом сохраняются конфигурация ДНК и благоприятное микроокружение, что делает полученные результаты более достоверными с точки зрения моделирования биохимических процессов *in vitro*.

Ранее нами было показано, что использование в качестве подложки электрода, покрытого многостенными углеродными нанотрубками (УНТ), дает дополнительные преимущества при регистрации специфических взаимодействий с участием ДНК, связанные с увеличением емкости поверхностного слоя в отношении биологических компонентов, а также с участием УНТ в медиаторном переносе электрона [5, 11].

В настоящей работе нами проведено сравнение характеристик переноса электрона методом измерения электрохимического импеданса с помощью ДНК-сенсоров, включающего в качестве биологического рецептора аптамеры к тромбину различного состава.

1. Экспериментальная часть

1.1. Материалы и оборудование. В исследовании использовали тромбин и сывороточный альбумин человека, метиленовый синий (Sigma-Aldrich), а также аптамеры на тромбин производства Thermo Electron Corporation (Германия) следующего состава:

1) BIOFIBRI:

5'-GGTTGGTGTGGTTGGAAAAAAAAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'-Biotin;

2) FIBRI:

5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGGTTGGTGTGGTTGG-3';

3) COMP:

5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3'.

Перед измерениями проводили гибридизацию polyT и polyA участков аптамеров BIOFIBRI и FIBRI или COMP путем смешения эквивалентных количеств аптамеров с нагревом раствора до 90°C и последующим медленным охлаждением.

Все измерения проводили в трис-буферном растворе следующего состава: 20 mM трис-(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7.6. Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

Многостенные УНТ (Aldrich, Cat № 636509, диаметр 10–30 нм, длина 0.5–500 мкм, не менее 95% углерода) перед использованием окисляли в смеси серной и азотной кислот при 60 °C в течение 3 ч в ультразвуковой бане, далее центрифугировали, отмывали дистиллированной водой и суспензировали в ДМФА из расчета 1 мг/мл. Полученная суспензия сохраняла седиментационную устойчивость в течение не менее двух недель. Перед использованием суспензию разбавляли ДМФА до требуемой концентрации.

Измерение электрохимического импеданса проводили с помощью модуля FRA потенциостата AUTOLAB PGSTAT 302 (EcoChemie, Голландия) в присутствии 0.01 M K₃[Fe(CN)₆] и 0.01 M K₃[Fe(CN)₆] в интервале частот 0.04 Гц – 100 кГц; амплитуда 5 мВ, потенциал электрода 0.235 В. Обработку результатов измерения импеданса проводили с помощью программного обеспечения GPES. Метиленовый синий полимеризовали в режиме циклической постоянноточковой вольтамперометрии с помощью потенциостата AUTOLAB PGSTAT 302 на стеклоуглеродном электроде диаметром 1.7 мм. Противоеlectродом служила платиновая проволока, электродом сравнения – хлорид-серебряный электрод сравнения.

1.2. Изготовление ДНК-сенсора и измерение его сигнала. Стеклоуглерод механически полировали, промывали водой, NaOH и H₂SO₄, сушили. На рабочую поверхность наносили 6 мкл суспензии УНТ в ДМФА 0.1 мг/мл и сушили при 100 °С в течение 15 мин. После этого на электрод наносили 5 мкл раствора аптамера, через 20 мин промывали и проводили измерение электрохимического импеданса. При определении концентрации тромбина на рабочую поверхность наносили 5 мкл раствора тромбина с концентрацией $1 \cdot 10^{-6} - 1 \cdot 10^{-9}$ М, далее промывали и повторяли измерение электрохимического импеданса. В экспериментах с полимерной формой метиленового синего электрод после нанесения слоя УНТ опускали в раствор, содержащий 2 мМ метиленового синего в трис-буферном растворе, рН 7.6. Проводили пятикратное циклирование потенциала электрода в диапазоне от -700 до 1100 мВ при скорости развертки 100 мВ/с. Затем электрод промывали дистиллированной водой и проводили десятикратное циклирование потенциала в диапазоне от -700 до 1100 мВ при скорости развертки 100 мВ/с в чистом TRIS-буферном растворе, рН 7.6. Далее наносили аптамер и проводили определение тромбина, как описано выше.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Выбор рабочих условий нанесения биочувствительного слоя ДНК-сенсора. Для иммобилизации аптамеров использовали положительно заряженный слой полимерной формы метиленового синего, образующийся в результате многократного циклирования потенциала в нейтральной или слабощелочной среде. Эффективность данного подхода ранее была подтверждена при изучении взаимодействий нативной ДНК со специфическими белками [12], а также при создании аптасенсоров с пьезометрической и амперометрической регистрацией сигнала [13]. О процессе осаждения продукта полимеризации можно судить по характеристическим изменениям пиков на вольтамперограммах, зарегистрированных в 2.0 мМ растворах мономера в трис-буферном растворе (рис. 1).

Полимеризация инициируется образованием катион-радикала метиленового синего при потенциале 1.0 В относительно Ag/AgCl. По мере накопления полимерной формы обратимость пика окисления-восстановления мономера снижается, потенциал анодного пика смещается к более анодным потенциалам. В области 0–0.2 В появляется плохо выраженная пара уширенных пиков, отнесенных по литературным данным к полимеру метиленового синего. Накопление полимерной формы начинается с третьего цикла сканирования. По сравнению с ранее полученными данными полимеризации на гладком стеклоуглеродном электроде окисление-восстановление мономерной формы метиленового синего происходило при потенциалах, меньших на 200–250 мВ. Это может быть отнесено к облегчению переноса электрона за счет медиаторных свойств УНТ. Кроме того, может происходить электростатическая аккумуляция положительного заряженного метиленового синего на отрицательно заряженном слое УНТ. Попытки нанесения аптамеров непосредственно на полимерный слой метиленового синего привели к слабовоспроизводимым параметрам электрохимического импеданса, что связано с низкой стабильностью полимерного слоя.

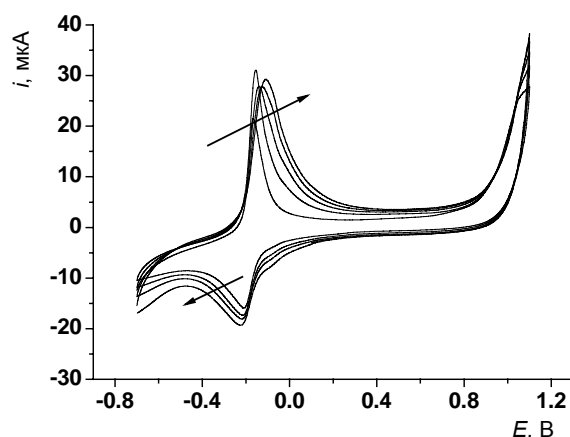


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы 2.0 мМ метиленового синего в трис-буферном растворе, рН 7.6. Стрелками показано изменение положения пиков от первого к пятому циклу сканирования потенциала. Скорость развертки 100 мВ/с

Для его стабилизации нами предложено проводить многократное циклирование потенциала модифицированного электрода в буферном растворе, не содержащем мономерной формы. При этом происходит уплотнение полимерной формы за счет вытеснения из нее плохо связанных компонентов и мономерного метиленового синего, захваченного в пленку полимера в процессе электрополимеризации. На вольтамперограммах, полученных при таком циклировании, более отчетливо проявляется пара пиков полимерной формы, а острые пики мономера практически исчезают (рис. 2).

Эксперименты показали, что стабилизация электрохимических характеристик покрытия достигается к десятому циклу сканирования потенциала, после чего изменение токов на вольтамперограммах прекращается. Полученные таким образом модифицированные электроды с УНТ и поли(метиленовым синим) в поверхностном слое показывают стабильные электрохимические характеристики в течение нескольких дней хранения в буферном растворе.

Помимо полимеризации метиленового синего были установлены рабочие условия нанесения УНТ. Как показали эксперименты с различными суспензиями УНТ, которые содержали активированные нанотрубки от 0.1 до 1 мг/мл, с увеличением содержания УНТ на поверхности сенсора (концентрации суспензии при сохранении наносимого объема) происходило закономерное снижение сопротивления переноса заряда, измеряемого по параметрам электрохимического импеданса. Это может быть связано с увеличением толщины слоя УНТ на электроде и образованием более плотного слоя, обладающего собственной электропроводностью. На рис. 3 приведены диаграммы Найквиста, показывающие зависимость активной и мнимой части сопротивления при различных частотах генерирующего напряжения на электрод.

Полукруг в области высоких частот отвечает лимитирующей стадии переноса заряда, сопротивление переноса заряда определяется исходя из радиуса окружности. Вторая часть графика, аппроксимируемая прямой линией при меньших значениях частоты, отвечает лимитирующему контролю диффузионного переноса заряда.

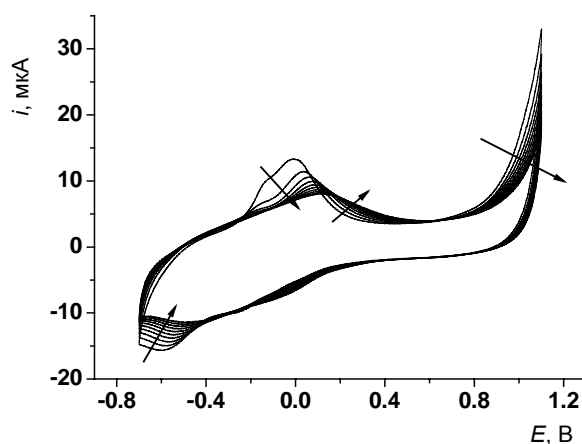


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы на стеклоуглеродном электроде, модифицированном УНТ и поли(метиленовым синим), в трис-буферном растворе, не содержащем мономера метиленового синего. Стрелками показано изменение токов от первого к десятому циклу сканирования. Скорость развертки 100 мВ/с

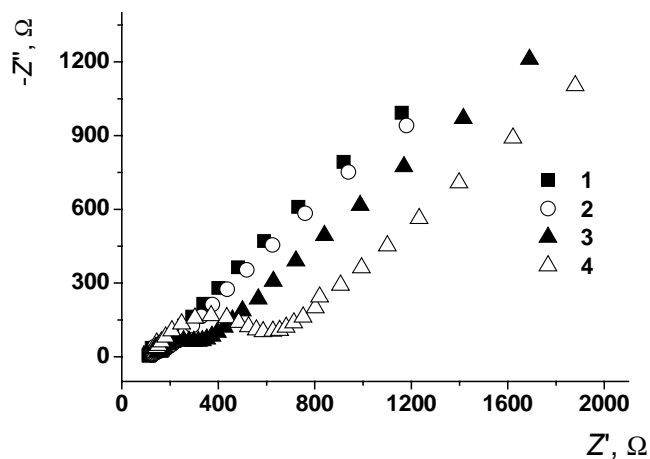


Рис. 3. Диаграммы Найквиста, полученные на стеклоуглеродном электроде, модифицированном УНТ. 0.01 М $K_3[Fe(CN)_6]$, 0.01 М $K_4[Fe(CN)_6]$. Измерения при 0.235 В относительно Ag/AgCl. Частота 0.04 Гц – 100 кГц, амплитуда 5 мВ. Концентрация УНТ 1 (1), 0.5 (2), 0.25 (3) и 0.1 мг/мл (4), нанесение 6 мкл суспензии на электрод

Вместе с тем использование минимальной концентрации УНТ (0.1 мг/мл) показало лучшую воспроизводимость характеристик полимеризации метиленового синего. Поэтому последующие эксперименты проводили в следующих условиях: модификация электрода суспензией УНТ 0.1 мг/мл (6 мкл на электрод), электрополимеризация 2.0 мМ метиленового синего в трис-буферном растворе, рН 7.6 (5 циклов).

2.2. Импедиметрическое измерение тромбина. Полученные стеклоуглеродные электроды, модифицированные УНТ, использовали для иммобилизации аптамеров BIOFIBRI, BIOFIBRI-FIBRI и BIOFIBRI-COMP. Иммобилизацию

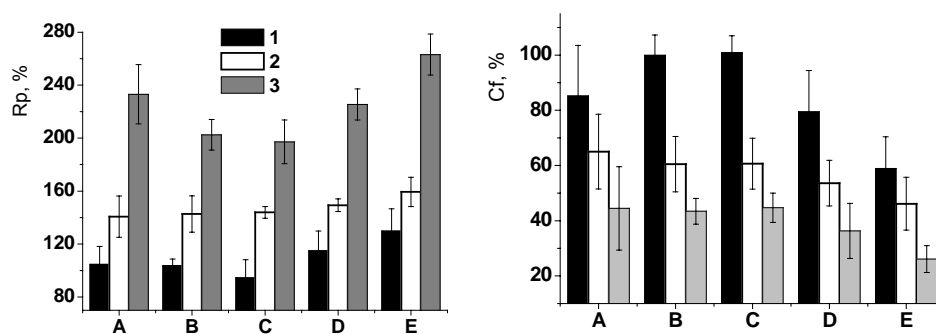


Рис. 4. Относительное изменение параметров сопротивления переноса заряда (R_p) и емкости поверхностного слоя (C_f) от состава поверхностного слоя. Аптасенсор до (A) и после контакта с тромбином концентраций 10^{-9} (B), 10^{-8} (C), 10^{-7} (D), 10^{-6} (E) М. 100% – параметры электрохимического импеданса электрода, покрытого УНТ. Аптамеры BIOFIBRI (1), BIOFIBRI-COMP (2), BIOFIBRI-FIBRI. Приведены средние данные и погрешность определения для измерений с шестью ДНК-сенсорами

проводили путем адсорбции, инкубируя электрод в растворе аптамера с последующей отмывкой плохо связанных олигонуклеотидов. Адсорбционная иммобилизация не требует присутствия в молекуле биотина, однако его наличие повышает устойчивость аптамера к эндонуклеазам, поэтому в экспериментах использовали биотинированный аптамер. Ранее в аналогичных условиях методом пьезокварцевого микровзвешивания было установлено [11], что сорбционная иммобилизация аптамера BIOFIBRI на УНТ позволяет достичь его концентрации $1.2 \cdot 10^{-11}$ моль/см². По тем же экспериментам электрополимеризация метиленового синего позволяет получить на электроде до 10^{-7} моль/см² полимерной формы красителя. Из этого можно заключить, что в составе поверхностного слоя аптамера преимущественно контактирует с поли(метиленовым синим), а не с УНТ. Этому способствуют также электростатические взаимодействия между положительно заряженным полимером и отрицательно заряженным аптамером.

Были определены параметры электрохимического импеданса – сопротивление переноса заряда на границе электрод – раствор и емкость поверхностного слоя для электродов с включением аптамеров различного строения. Результаты измерений представлены на рис. 4.

Нанесение поверх УНТ аптамера BIOFIBRI приводит к наименьшим изменениям характеристик электрохимического импеданса (рис. 4, см. слева А). Для мономера BIOFIBRI и двухцепочечных аптамеров последующие изменения характеристик импеданса в присутствии тромбина незначительны по сравнению с влиянием собственно олигонуклеотидов. Можно отметить только увеличение сопротивления переноса заряда при концентрации тромбина, превышающей 10^{-7} М, что связано с образованием комплекса аптамер-тромбин и увеличением диффузионного сопротивления переноса феррицианида в пределах поверхностного слоя. Одновременно уменьшается емкость поверхностного слоя, что связано с уменьшением разделения заряда в силу экранирования отрицательного заряда фосфатных групп остова аптамера белком.

Табл. 1

Характеристики определения тромбина с помощью ДНК-сенсора на основе стеклоуглеродного электрода, покрытого УНТ и поли(метиленовым синим) и аптамерами различного состава. Измерения в трис-буферном растворе

Аптамер	$R_p, \% = a + b \cdot \lg c$		
	a	b	R^2
BIOFIBRI	243 ± 15	16 ± 1	0.9564
BIOFIBRI-COMP	210 ± 10	12 ± 1	0.9602
BIOFIBRI-FIBRI	234 ± 9	9 ± 1	0.9773
Аптамер	$C_f, \% = a + b \cdot \lg c$		
	a	b	R^2
BIOFIBRI	14 ± 1	-5.3 ± 0.2	0.9959
BIOFIBRI-COMP	-13 ± 4	-8.3 ± 0.5	0.9874
BIOFIBRI-FIBRI	10 ± 2	-4.4 ± 0.3	0.9837

При нанесении поли(метиленового синего) поверх УНТ изменения характеристик электрохимического импеданса ДНК-сенсора выражены значительно сильнее. Наблюдается монотонное изменение параметров сопротивления и емкости во всем изученном интервале концентраций тромбина. Несмотря на то что абсолютные значения указанных изменений были значительно меньше, чем в отсутствие поли(метиленового синего), они были лучше воспроизводимы и линейно зависели от концентрации тромбина в интервале его концентраций $n(10^{-9} - 10^{-6})$ М. Характеристики определения тромбина приведены в табл. 1.

Очевидно, что присутствие противоположно заряженных слоев поверхностного слоя улучшает параметры воспроизводимости характеристик покрытия, в том числе при связывании аптамера и тромбина. В результате, хотя максимальное изменение параметров сопротивления и емкости не превышает 100% (ср. рис. 4 для аналогичного сенсора в отсутствие слоя поли(метиленового синего)), относительная погрешность измерения наклона линейной зависимости составила 2–4%.

Сравнение результатов измерения с различными аптамерами показало, что наименьшее влияние тромбина получено для димера BIOFIBRI-FIBRI с двумя центрами связывания. Возможно, это связано со стерическими факторами. Гибридизация тагов polyT и polyA приводит к повышению плотности отрицательного заряда на компактной «ножке» димера. В результате ориентация аптамера на электроде приводит к относительному удалению центров связывания тромбина от электрода и, возможно, частичному нарушению требуемой координации белка и аптамера. Это косвенно подтверждает сопоставление характеристик аптамеров BIOFIBRI-FIBRI и BIOFIBRI-COMP. Второй отличается отсутствием второго центра связывания тромбина при сохранении тага poly(AT). Удаление второго центра связывания, присутствующего в димере BIOFIBRI-FIBRI, повысило чувствительность определения тромбина почти в 2 раза по характеристикам емкости поверхностного слоя и на треть – по параметрам сопротивления переноса заряда.

Дальнейшее упрощение структуры аптамера (BIOFIBRI по сравнению с димерами) приводит к неоднозначным результатам. Чувствительность сопротивления переноса заряда при этом возрастает, что отвечает более плотной упаковке комплекса аптамер-тромбин на поверхности сенсора. Однако емкость поверхностного слоя, отражающая степень разделения заряда слоев модифицирующего покрытия, меняется сильнее для димерных аптамеров. Последнее хорошо объясняется более высокой плотностью отрицательного заряда гибридной части сенсора poly(AT) и, как следствие, более высокой чувствительностью распределения заряда от присутствия в растворе тромбина.

В отличие от характеристик импеданса, интервал определяемых концентраций и предел обнаружения тромбина для всех исследованных аптамеров были одинаковы. Разработанные ДНК-сенсоры позволяют проводить определение 10^{-9} – 10^{-6} М тромбина при пределе обнаружения 0.3–0.5 нМ. Это лучше, чем характеристики определения тромбина с помощью аналогичного пьезометрического сенсора с электродами, модифицированными только полифенотиазиновыми красителями [11] (10–13 нМ в зависимости от природы красителя), и сопоставимо с характеристиками ДНК сенсора на основе димера BIOFIBRI-FIBRI, иммобилизованного поверх УНТ [5] (предел обнаружения для пьезокварцевого микровзвешивания – 0.3 нМ). Наименьший предел обнаружения тромбина был получен с помощью импедиметрического сенсора на основе самоорганизующихся слоев на золотом электроде (предел обнаружения – 0.01 нМ). Снижение предела обнаружения достигнуто за счет увеличения числа центров связывания поверхностного слоя в результате иммобилизации аптамера на поли(амидоамине) – дендримере 4 поколения [15].

Авторы выражают благодарность профессору Т. Хианику (Университет Комениуса, Братислава, Словакия) за предоставление аптамеров и участие в обсуждении результатов импедиметрического эксперимента.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проекты № 08-03-00161-а и 09-03-92420-КЭ_а) и гранта программы Президента РФ «Молодые кандидаты наук» МК-249.2009.3.

Summary

A.V. Porfirieva, G.A. Evtugin, M.A. Savelieva, H.C. Budnikov. Impedimetric DNA Sensor Based on Electrodes Modified with Carbon Nanotubes, Poly(Methylene Blue) and Aptamers toward Thrombin.

Impedimetric sensors based on electrodes modified with carbon nanotubes and poly(methylene blue) have been proposed. It is shown that polyphenothiazine promotes aptamer adsorption and improves analytical characteristics of thrombin determination due to electrostatic interactions of oppositely charged components of the coating and steric limitations of aptamer-thrombin interactions. DNA-sensors developed make it possible to determine 10^{-9} – 10^{-6} M thrombin.

Key words: DNA-sensor, aptasensor, biosensor, electrochemical impedance measurement, electropolymerization, thrombin determination.

Литература

1. *Sassolas A., Leca-Bouvier B.D., Blum L.J.* DNA biosensors and microarrays // *Chem. Rev.* – 2008. – V. 108. – P. 109–139.
2. *Rogers K.M., Apostol A., Madsen S.J., Spenser C.W.* Fiber optic biosensor for detection of DNA damage // *Anal. Chim. Acta.* – 2001. – V. 444. – P. 51–60.
3. *Hianik T., Ostatna V., Zajacova Z., Stoikova E., Evtugyn G.* Detection of aptamer-protein interactions using QCM and electrochemical indicator methods // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2005. – V. 15. – P. 291–295
4. *Feng K., Li J., Jiang J.-H., Shen G.-L., Yu R.-Q.* QCM detection of DNA targets with single-base mutation based on DNA ligase reaction and biocatalyzed deposition amplification // *Biosens. Bioelectron.* – 2007. – V. 22. – P. 1651–1657.
5. *Hianik T., Porfireva A., Grman I., Evtugyn G.* EQCM biosensors based on DNA aptamers and antibodies for rapid detection of prions // *Protein Peptide Lett.* – 2009. – V. 16. – P. 363–367.
6. *Mascini M., Palchetti I., Marrazza G.* DNA electrochemical biosensors // *Fresenius J. Anal. Chem.* – 2001. – V. 369. – P. 15–22.
7. *Fojta M.* Electrochemical sensors for DNA interactions and damage // *Electroanalysis.* – 2002. – V. 14. – P. 1449–1463.
8. *Kerman K., Kobayashi M., Tamiya E.* Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology // *Meas. Sci. Technol.* – 2004. – V. 15. – P. R1–R11.
9. *Erdem A.* Nanomaterial-based electrochemical DNA sensing strategies // *Talanta.* – 2007. – V. 74. – P. 318–325.
10. *Hianik T., Wang J.* Electrochemical aptasensors – recent achievements and perspectives // *Electroanalysis.* – 2009. – V. 21. – P. 1223–1235.
11. *Hianik T., Porfireva A., Grman I., Evtugyn G.* Aptabodies – new type of artificial receptors for detection proteins // *Protein Peptide Lett.* – 2008. – V. 15. – P. 799–805.
12. *Evtugyn G.A., Porfireva A.V., Hianik T., Cheburova M.S., Budnikov H.C.* Potentiometric DNA sensor based on electropolymerized phenothiazines for protein detection // *Electroanalysis.* – 2008. – V. 20. – P. 1300–1308.
13. *Evtugyn G., Porfireva A., Ivanov A., Konovalova O., Hianik T.* Molecularly imprinted polymerized Methylene Green as a platform for electrochemical sensing of aptamer – thrombin interactions // *Electroanalysis.* – 2009. – V. 21. – P. 1272–1277.
14. *Porfirieva A., Evtugyn G., Hianik T.* Polyphenothiazine modified electrochemical aptasensor for detection of human α -thrombin // *Electroanalysis.* – 2007. – V. 19. – P. 1915–1920.
15. *Zhang Z., Yang W., Wang J., Yang C., Yang F., Yang X.* A sensitive impedimetric thrombin aptasensor based on polyamidoamine dendrimer // *Talanta.* – 2009. – V. 78. – P. 1240–1245.

Поступила в редакцию
07.09.09

Порфирьева Анна Вениаминовна – кандидат химических наук, инженер кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: porfireva-a@inbox.ru

Евтюгин Геннадий Артурович – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: Gennady.Evtugyn@ksu.ru

Савельева Мария Анатольевна – студент кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Будников Герман Константинович – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

E-mail: *Herman.Budnikov@ksu.ru*