

Министерство образования и науки Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ОТЧЕТ о деятельности OpenLab  
«ДНК-Сенсоры»

Научный руководитель  
Профессор  
Д.Х.Н.

30.09.15

Евтюгин Г.А.  
подпись, дата

Руководитель приоритетного направления  
Профессор  
Д.Ф.-м.н.

Таюрский Д.А.

подпись, дата

Казань 2015

Название лаборатории, дата создания: ОпенЛаб «ДНК-Сенсоры» (квалификационный код в структуре КФУ 01.2.07.2.29, приказ №01-06/189 от 03.03.2014 с изменением №01-06/319 от 14.04.2015)

Научный руководитель лаборатории: д.х.н. профессор Евтугин Геннадий Артурович, заведующий кафедрой аналитической химии Химического института им.А.М.Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета, контактный телефон 843-2337491, e-mail Gennady.Evtugyn@kpfu.ru

Место расположения лаборатории: Химический институт им.А.М.Бутлерова, лабораторный корпус, комн. 508, тел. 2337491, e-mail Gennady.Evtugyn@kpfu.ru.

#### Приоритетное направление ППК: Приоритетные материалы

#### Основные направления работы лаборатории:

1. Разработка новых гибридных материалов с включением ДНК для регистрации биохимического распознавания
2. Разработка ДНК-сенсоров для определения окислительного повреждения ДНК и содержания противораковых препаратов, специфически связывающихся с ДНК
3. Разработка сенсоров на основе новых элементов биохимического распознавания, определение микотоксинов и белков, специфически связывающихся с ДНК

#### Проекты НИР, выполняемые в лаборатории в 2014-2015 гг.

1. Проект РНФ № 14-13-00058 «Пилларарены как новая синтетическая платформа для создания электрохимических (био)сенсоров»
2. Грант РФФИ № 14-03-31275 «Электрохимические сенсоры для определения лекарственных препаратов, взаимодействующих с ДНК, на основе переключаемых преобразователей сигнала»
3. Грант РФФИ № 14-03-00409 «Электрохимические (био)сенсоры для определения биологически важных органических соединений на основе новых рН-переключаемых хеморезисторных структур»
4. Грант РФФИ № 15-03-03224 «Новые электрохимические сенсоры для определения окисляющихся органических соединений на основе медиаторов в мезопористых электроактивных матрицах»
5. Проект «Сенсор» Программы повышения конкурентоспособности КФУ

#### Кадровый состав:

1. Гианик Тибор, д. ф.-м.н., профессор, 16.09.1952, ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией биофизики Университета Коменского в Братиславе.  
Привлеченные сотрудники, участвующие в выполнении НИР:
  2. Кузин Юрий Иванович, аспирант, 10.08.1991, инженер-проектировщик 1 категории отдела аналитической химии
  3. Степанова Вероника Борисовна, к.х.н., 12.08.1987, младший научный сотрудник отдела биоэлектрохимических и биосенсорных исследований отдела аналитической химии КФУ.
  4. Смолко Владимир Андреевич, аспирант, 21.07. 1993, инженер отдела биоэлектрохимических и биосенсорных исследований отдела аналитической химии КФУ

#### Перечень дорогостоящего научного оборудования:

1. Система анализа поверхностного плазмонного резонанса ESPRIT (Metrohm Autolab, Швейцария), 2012
2. Проточный электрохимический анализатор CHI 440 В (CH Instruments, США), 2014
3. Потенциостат-гальваностат AUTOLAB PGSTAT 302N с системой измерения пьезокварцевого эффекта (модель EQCM), 2012

#### Научные партнеры OpenLab

Университет Коменского в Братиславе, Словакия, лаборатория биофизики

Стажировки сотрудников Open Lab в российских и зарубежных научных организациях и вузах за 2014-2015 гг.

1. Кузин Ю.И., апрель-июнь 2014 г., Университет Коменского в Братиславе, Словакия, лаборатория биофизики, научная стажировка
2. Степанова В.Б., сентябрь – декабрь 2014 г., Университет Коменского в Братиславе, Словакия, лаборатория биофизики, научная стажировка (Республиканская программа «Алгарыш», софинансирование 10% КФУ)
3. Евтушин Г.А., 1-15 мая 2014 г., Университет Коменского в Братиславе, Словакия, лаборатория биофизики, научная стажировка (финансирование ППК)
4. Евтушин Г.А., 1-30 апреля 2015 г., Университет Коменского в Братиславе, Словакия, лаборатория биофизики, научная стажировка (индивидуальный грант Словацкой программы академических обменов SAIA)

Подготовка кадров высшей квалификации (аспирантура и докторантура) на базе OpenLab в 2014-2015 гг.

1. Кузин Юрий Иванович, планируемая защита – 2016 г., тема диссертации «Электрохимические и пьезометрические ДНК-сенсоры для определения окислительного повреждения ДНК»
2. Смолко Владимир Андреевич, планируемая защита – 2018 г., тема диссертации «Электрохимические сенсоры и биосенсоры на основе пиллар[5]арена и его производных»

Научные отчеты по проектам НИР, выполняемых в OpenLab в 2014 и 2015 гг.

2014 г. (рег.№ отчета проекта «Сенсор» 01201464820, проекта РНФ 114081940012)

1. Проект РНФ № 14-13-00058 «Пилларарены как новая синтетическая платформа для создания электрохимических (био)сенсоров», № гос.регистрации 114081940012

Впервые синтезированы пиллар[5]арены, содержащие морфолидные и пирролидидные группы, пошаговой функционализацией гидроксилированного пиллар[5]арена. Синтезированы новые катионные водорастворимые пиллар[5]арены, содержащие триметиламмонийные / метилдиметиламмонийные группы на верхнем и нижнем ободах макроцикла, пошаговой функционализацией полностью гидроксилированного пиллар[5]арена. Исследована комплексообразующая способность 4,8,14,18,23,26,28,31,32,35-дека-[{(гидроксикарбокси)метокси}-пиллар[5]арена, 4,8,14,18,23,26,28,31,32,35-декакис-[(N-пирролидидокарбонил)метокси]пиллар[5]арена и 4,8,14,18,23,26,28,31,32,35-декакис-[(N-морфолидокарбонил)метокси]пиллар[5]арена по отношению к катионам щелочных (лития, натрия, калия и цезия) и переходных (меди (II) и серебра) металлов. Было обнаружено, что все образованные комплексы имеют стехиометрию 1:1 независимости от структуры функциональных групп на верхнем и нижнем ободах пиллар[5]аренов и размеров «гостя». Стехиометрия комплексов состава 1:1 с катионами лития, натрия, калия и цезия была подтверждена также методом изомолярных серий. Логарифмы констант ассоциации полученных комплексов находились в пределах от 2.15 до 3.60. Низкая селективность объясняется тем, что в комплексообразовании участвуют фенольные атомы кислорода, а не функциональные группы. Катионы переходных металлов (меди (II) и серебра) в органических растворителях не связываются производными пиллар[5]арена. Изучено комплексообразование π-толуолсульфокислоты как «гостя» водорастворимыми пиллар[5]аренами - 4,8,14,18,23,26,28,31,32,35-декакис-[(N-(3',3',3'-триметиламмонийпропил)-карбамоилметокси)-пиллар[5]арен декайдодидом и 4,8,14,18,23,26,28,31,32,35-декакис-[(N-(2'-метил-2',2'-диэтиламиноэтил)-карбамоилметокси]-пиллар[5]арен декайдодидом. Методом 2D ЯМР NOESY <sup>1</sup>Н-<sup>1</sup>Н спектроскопии определено, что «гость» включен в полость макроцикла и образовался комплекс включения. Методами кулонометрии, вольтамперометрии и спектроскопии электрохимического импеданса проведено комплексное исследование электрохимических превращений незамещенного пиллар[5]арена и установлена стехиометрия переноса электронов и ионов водорода в лимитирующей стадии процесса, проведена оценка параметров электронного переноса (коэффициент переноса, гетерогенная константа скорости переноса электрона). Если в ~~гетерогенных~~ условиях окисление сопровождается переносом 10 электронов на молекулу

пиллар[5]арена, на поверхности сенсора первоначально образуется продукт б-электронного окисления с образованием стабилизированных водородными связями ассоциатов по типу хингидрона. Его окисление протекает при более высоких потенциалах, что приводит к разделению пиков на вольтамперограммах. Неустойчивость сигналов на вольтамперограммах, зарегистрированных на чистом стеклоуглероде, связана с сорбционными процессами и агрегацией промежуточных продуктов окисления на поверхности сенсора. Модификация стеклоуглерода полианилином и частично окисленной углеродной чернью стабилизирует сигнал сенсора и увеличивает максимальные токи окисления-восстановления пиллар[5]арена. Сорбционный перенос макроцикла и устойчивость продукта накопления были подтверждены с помощью пьезокварцевого микровзвешивания. Установлена возможность потенциометрического определения ионов меди в присутствии большинства других катионов металлов на твердоконтактном потенциометрическом сенсоре с полианилином и незамещенным пиллар[5]ареном с определением 1 мкМ – 10 мМ ионов меди (2+). Рассчитаны потенциометрические коэффициенты селективности и определены условия измерения, нивелирующие мешающее влияние pH-чувствительности потенциала системы. Проведено сравнение аналитических и операционных характеристик потенциометрических сенсоров на основе полианилина, углеродной черни и пиллар[5]аренов с введением в состав макроцикла пирролидидных и морфолидных заместителей. Показано, что замещенные таким образом пиллар[5]арены увеличивают потенциометрическую селективность сигнала в отношении меди (2+) и частично подавляют pH-чувствительность потенциала сенсора за счет собственных буферных свойств. Разработанный твердоконтактный потенциометрический сенсор был апробирован в определении ионов меди (II) в поливитаминном комплексе «Компливит» и бордосской жидкости. Также показана возможность определения аскорбиновой кислоты в интервале ее концентраций от 1 мкМ до 1 мМ. Предложены вольтамперометрические сенсоры на основе электродов, модифицированных углеродной чернью и наночастицами серебра, полученными при химическом восстановлении нитрата серебра незамещенным пиллар[5]ареном. За счет взаимного влияния компонентов такого гибридного покрытия резко увеличивается чувствительность определения ряда аналитов. Так, абсолютное значение плотности тока электрокatalитического восстановления пероксида водорода было сопоставимо с характеристикой электрода, модифицированного берлинской лазурью. Предложено использовать вольтамперометрический сенсор для определения тиохолина по току его окисления. Присутствие наночастиц серебра и пиллар[5]арена снизило рабочий потенциал измерения сигнала на 200 мВ и повысило чувствительность отклика по сравнению с аналогичными измерениями на электроде, модифицированном только углеродной чернью. Полученные результаты позволяют считать, что модификация электродов пиллар[5]ареном и серебром может быть с успехом использована при создании биосенсоров для определения субстратов и ингибиторов холинэстераз, а также для регистрации активности различных оксидоредуктаз.

## 2. Грант РФФИ № 14-03-31275 «Электрохимические сенсоры для определения лекарственных препаратов, взаимодействующих с ДНК, на основе переключаемых преобразователей сигнала»

Разработаны новые биосенсоры на основе нативной ДНК, включенной в состав электрополимеризованных слоев нейтрального красного или анилина, содержащих наноразмерные медиаторы электронного переноса – феназиновый краситель нейтральный красный, иммобилизованный на непроводящем тиакаликсарене или наночастицы серебра. Изучены условия формирования поверхностных слоев и влияние компонентов на процесс электрополимеризации и характеристики электронного обмена. Показано, что в присутствии антрациклических препаратов интеркалирующего действия (доксорубицин, даунорубицин и идарубицин) в концентрациях более 1 нМ происходит увеличение сопротивления переноса заряда в слое за счет внедрения молекул анализа в биополимер. Интеркалирование сопровождается увеличением собственного объема молекул ДНК и разделением заряда в слое. Установлена возможность вольтамперометрического определения антрациклинов по уменьшению сигнала окисления-восстановления наноразмерных медиаторов и собственной электрохимической активности полианилина. Разработанные вольтамперометрические ДНК-сенсоры позволяют проводить определение до 0.05 нМ антрациклических препаратов. Показана возможность полуколичественного определения метиленового синего по смещению равновесного потенциала слоя ДНК-полианилин. Разработанные биосенсоры прошли апробацию на стандартных растворах

аналитов и лекарственных формах, содержащих стабилизаторы – антиоксиданты. В смесях антрациклических препаратов происходит аддитивное сложение отклика на индивидуальные препараты. Предложены пути подавления мешающего влияния антиоксидантов на определение доксорубицина.

3. Грант РФФИ № 14-03-00409 «Электрохимические (био)сensоры для определения биологически важных органических соединений на основе новых рН-переключаемых хеморезисторных структур»

Разработаны способы получения и охарактеризованы электрохимические свойства новых гибридных материалов на основе полиамилина и ДНК, получаемые из их раствора путем электрополимеризации в щавелевой кислоте. Проведено сравнение характеристик окисления-восстановления полученных покрытий и гибридных пленок полиамилин – ДНК, получаемых при послойном нанесении полиамилина или полигидроксиамилина и полистиролсульфоната и нафиона. Включение ДНК в растущую пленку полимера в средах низкой кислотности сохраняет нативную структуру биополимера, его способность к интеркалированию антрациклическими препаратами, а также улучшает характеристики электронного обмена в пленке за счет более полного контакта полиелектролитов и влиянию щавелевой кислоты на структуру и диффузационную проницаемость полиамилина. При совместном осаждении полиамилина и ДНК улучшается обратимость электронного переноса и регулярность строения полимерного слоя (по данным атомно-силовой микроскопии). Изучено рН-переключение редокс-активности синтезированных покрытий и показана возможность сдвига максимального значения рН проявления собственной электрохимической активности полиамилина в нейтральную и слаботщелочную область. Это позволило улучшить характеристики электрокаталитического определения гидрохинона, пероксида водорода и дофамина. В последнем случае показано изменение лимитирующего процесса, определяющего потенциал переноса электрона, от окисления лейко-эмERALдина в кислой среде и к окислению дофамина в нейтральной и щелочной. По сравнению с послойным нанесением ДНК и полиамилина пределы обнаружения антиоксидантов снижены в 10-100 раз, чувствительность вольтамперометрического сигнала увеличена в 1.2-1.5 раза. Получены наноразмерные частицы серебра, отличающиеся близкими размерами и равномерным распределением в матрице полиамилина и ДНК путем химического восстановления ионов серебра, аккумулируемых молекулами ДНК в поверхностном слое. По сравнению с катодным восстановлением серебра предложенный способ позволяет значительно увеличить концентрацию наночастиц при сохранении их среднего размера в 10-20 нм. Присутствие серебра меняет морфологию вольтамперных кривых за счет включения в цепь переноса электрона между окисленной и восстановленной формой полиамилина, что улучшает характеристики медиаторного окисления тиохолина и ряда антиоксидантов. Достигнуто снижение рабочего потенциала окисления и увеличена стабильность отклика, достаточная для применения разработанного сенсора в составе холинэстеразного биосенсора для определения ингибиторов фермента. Проведено тестирование разработанных сенсоров с гибридными покрытиями полиамилин – ДНК с модельным антрациклическим препаратом и установлена возможность определения наномолярных количеств доксорубицина при рН 7.0 по изменению тока восстановления окисленной формы полиамилина и увеличению сопротивления переноса заряда в импедиметрическом сенсоре. Рассмотрено влияние рН и состава рабочего раствора на аналитические характеристики определения доксорубицина в сравнении с аналогичными биосенсорами с традиционным способом синтеза полиамилина. Полученные в результате выполнения проекта результаты подтверждают важность рН-переключения электрохимической активности покрытия для достижения задач определения окисляющихся соединений и низкомолекулярных агентов, специфически связывающихся с ДНК.

4. Проект «Сенсор» Программы повышения конкурентоспособности КФУ, № гос. регистрации 01201464820

Предложен новый подход к определению низкомолекулярных соединений, специфически связывающихся с аптамерами, с помощью электрохимических биосенсоров с вольтамперометрической или импедиметрической регистрацией сигнала. Регистрация биохимических взаимодействий осуществляется по изменению электрохимической

активности или проницаемости поверхностного слоя для низкомолекулярных ионов – носителей заряда. Повышение чувствительности сигнала достигается за счет пространственного разделения редокс-центров слоя с сохранением возможности электронообменных процессов между ними. Включение молекул определяемых веществ снижает скорость обмена электронами, что выражается в снижении регистрируемых токов и увеличении сопротивления переноса заряда на границе электрод (биосенсор) – раствор. Для реализации предложенного подхода разработан способ модификации стеклоуглеродного электрода полимерной пленкой феназинового красителя (нейтральный красный) путем электрополимеризации с последующей самосборкой противоположно заряженных слов поликарбоксилированных макроциклических соединений (производные тиакаликс[4]арена) и редокс-медиатора. Электростатическая самосборка обеспечивает воспроизводимость состава поверхностного слоя и устойчивость электрохимических характеристик сенсора. Проведена оптимизация состава слоя и условий включения в него аптамеров на тромбин и микотоксины. Разработан аптасенсор на афлатоксин В1, обеспечивающий определение 0.1-100 нМ с пределом обнаружения до 0.05 нМ. Аптасенсор апробирован на модельных объектах – образцах арахиса, орехов кэшью, соевого соуса и белового вина, загрязненных афлатоксином В1. Матричный эффект устраняется предварительным разбавлением соевого соуса и вина, а также экстрактов из орехов. Установлено, что выпадение твердых примесей в процессе разбавления снижает степень открытия афлатоксина на 15-20% от номинального содержания препарата, фильтрация экстракта перед измерением совместно с корректировкой pH и подбором степени разбавления позволяют достичь количественного определения загрязнителя на уровне его установленных нормативных значений.

#### 4. Сборник важнейших достижений OpenLab в 2014-2015 гг.

##### 1. Наименование результата:

Способ регистрации специфических взаимодействий с участием ДНК

##### 2. Результат научных исследований и разработок (выбрать один из п. 2.1 или п. 2.2)

###### 2.1. Результат фундаментальных научных исследований

- теория
- метод  X
- гипотеза
- другое (расшифровать):

###### 2.2. Результат прикладных научных исследований и экспериментальных разработок

- методика, алгоритм
- технология
- устройство, установка, прибор, механизм
- вещество, материал, продукт
- штаммы микроорганизмов, культуры клеток
- система (управления, регулирования, контроля, проектирования, информационная)
- программное средство, база данных
- другое (расшифровать):

##### 3. Результат получен в Приоритетном направлении развития науки, технологий и техники в Российской Федерации:

- Безопасность и противодействие терроризму
- Индустрия наносистем  X
- Информационно-телекоммуникационные системы
- Науки о жизни  X
- Перспективные виды вооружения, военной и специальной техники
- Рациональное природопользование
- Транспортные и космические системы
- Энергоэффективность, энергосбережение, ядерная энергетика

##### 4. Коды ГРНТИ:

31.19.29

##### 5. Назначение:

Создание электрохимических ДНК-сенсоров с улучшенными характеристиками чувствительности и избирательности регистрации специфических взаимодействий с участием ДНК и аналогичных биохимических рецепторов (действие интеркаляторов, химических повреждающих факторов, связывание белков)

##### 6. Описание, характеристики:

Метод основан на включении ДНК или родственных элементов биораспознавания (аптамеры, олигонуклеотиды) в полимерную непроводящую матрицу, содержащую систему распределенных окислительно-восстановительных центров, способных к реакциям электронного обмена, регистрируемых с помощью постояннотоковой вольтамперометрии и спектроскопии электрохимического импеданса. Регистрация сигнала связана с нарушением электронообменных процессов, протекающих в таком слое, при внесении в него непроводящих молекул анализаторов. Высокая чувствительность регистрации сигнала обусловлена регулярностью заполнения слоя и использованием наноразмерных носителей медиаторов. Простота сборки поверхностного слоя и регулярность распределения редокс-центров достигаются за счет самосборки заряженных компонентов на электродах, предварительно модифицированных поликатионными полимерами, получаемыми путем электрополимеризации.

##### 7. Правовая защита (ОИС):

Планируется оформление патента

##### 8. Авторы:

Евтиогин Геннадий Артурович, Порфириева Анна Вениаминовна, Степанова Вероника Борисовна

## 1. Наименование результата:

ДНК-сенсор для определения медицинских препаратов – интеркаляторов ДНК

## 2. Результат научных исследований и разработок (выбрать один из п. 2.1 или п. 2.2)

## 2.1. Результат фундаментальных научных исследований

- теория

- метод

- гипотеза

- другое (расшифровать):


## 2.2. Результат прикладных научных исследований и экспериментальных разработок

- методика, алгоритм

- технология

- устройство, установка, прибор, механизм

x

- вещество, материал, продукт

- штаммы микроорганизмов, культуры клеток

- система (управления, регулирования, контроля, проектирования, информационная)

- программное средство, база данных

- другое (расшифровать):


## 3. Результат получен в Приоритетном направлении развития науки, технологий и техники в Российской Федерации:

- Безопасность и противодействие терроризму

x

- Индустрия наносистем

- Информационно-телекоммуникационные системы

x

- Науки о жизни

- Перспективные виды вооружения, военной и специальной техники

x

- Рациональное природопользование

- Транспортные и космические системы

- Энергоэффективность, энергосбережение, ядерная энергетика

## 4. Коды ГРНТИ:

31.19.29

## 5. Назначение:

Определение сверхмалых количеств противораковых препаратов, способных интеркалировать молекул нативной (двойнитовой) ДНК

## 6. Описание, характеристики:

Биочувствительный слой ДНК-сенсора получают, проводя электрохимическую полимеризацию анилина в присутствии нативной ДНК в среде шавелевой кислоты. Благодаря низкой кислотности раствора молекулы ДНК сохраняют свою конфигурацию в полимерной матрице и способны участвовать в реакции интеркалирования с противораковыми препаратами. Реакция сопровождается изменением электрохимических характеристик полианилина за счет смещения равновесий его протонирования и окисления-восстановления. Сигналом сенсора является изменение тока окисления или сопротивления переноса заряда. Сенсор позволяет проводить определение до 0.01 нМ доксорубицина, 0.1 нМ даунорубицина и 0.2 нМ идарубицина. При их совместном присутствии регистрируется аддитивное сложение сигналов. Сульфаниламиды и сывороточные белки не мешают определению антрациклинов.

## 7. Правовая защита (ОИС):

Планируется оформление патента

## 8. Авторы:

Евтушин Геннадий Артурович, Порфириева Анна Вениаминовна, Шамагсумова Резеда Вакифовна

Список публикаций OpenLab за 2014-2015 г.:

1. Evtugyn, G.A. Electrochemical DNA sensors based on nanostructured organic dyes / DNA / polyelectrolyte complexes / G.A. Evtugyn, V.B. Stepanova, A.V. Porfireva, A.I. Zamaleeva, R.R. Fakhrullin, // J. Nanosci. Nanotechnol. - 2014. - V. 14, № 9. - P. 6738-6747 (WoS, Scopus)
2. Evtugyn, G. Electrochemical aptasensor based on polycarboxylic macrocycle modified with neutral red for aflatoxin B1 detection / G. Evtugyn, A. Porfireva, V. Stepanova, R. Sirdikov, I. Stoikov, D. Nikolelis, T. Hianik // Electroanalysis. - 2014. - V.26. - P.2100-2109 (WoS, Scopus).
3. Evtugyn, G. Electrochemical biosensors based on native DNA and nanosized mediator for the detection of anthracycline preparations / G. Evtugyn, A. Porfireva, V. Stepanova, H. Budnikov // Electroanalysis. - 2015.- V.27, № 2. - P.629-637 (Scopus).
4. Kuzin, Yu. Impedimetric detection of DNA damage with the sensor based on silver nanoparticles and neutral red / Yu. Kuzin, A. Porfireva, V. Stepanova, V. Evtugyn, I. Stoikov, G. Evtugyn, T. Hianik, Electroanalysis. – 2015. – in press. doi 10.1002/elan.201500312 (Scopus).