

УДК 543.558

**БИОСЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ  
ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТНЫХ КОМПЛЕКСОВ ДНК  
И ЭЛЕКТРОПОЛИМЕРИЗОВАННЫХ МАТЕРИАЛОВ**

*А.В. Порфирьева, В.Б. Костылева, А.И. Замалева, Г.А. Евтюгин,  
Р.Ф. Фахруллин, В.З. Латыпова*

**Аннотация**

Проведено изучение влияния состава комплексов на основе ДНК и синтетических полиэлектролитов, получаемых путем электростатической самосборки на поверхности электрополимеризованного слоя метиленового синего, на параметры электрохимического импеданса. Показано, что наибольшее влияние на сопротивление переноса заряда и емкость поверхностного слоя оказывает положение слоя ДНК в полиэлектролитном комплексе. Изучено изменение характеристик импеданса при повреждении молекул ДНК реактивом Фентона и установлена возможность регистрации характеристических изменений сопротивления переноса заряда и емкости слоя для обнаружения ДНК-повреждающих факторов.

**Ключевые слова:** ДНК-сенсор, полиэлектролитный комплекс, электрохимический импеданс, ДНК-повреждающие факторы.

**Введение**

Полиэлектролитные комплексы с участием природных (ДНК, белки) и синтетических (ПАВы, ионообменные смолы) компонентов активно применяют в составе биосенсоров различного назначения, средств доставки лекарственных препаратов и электрохромных устройств [1, 2]. Благодаря множественным взаимодействиям между слоями такие комплексы отличаются высокой устойчивостью. Их формирование путем послойного нанесения противоположно заряженных компонентов отличается регулярностью и воспроизводимостью характеристик. Присутствие полиэлектролитов создает благоприятную среду для биомакромолекул, что позволяет рассматривать полиэлектролитные комплексы как простейшие модели биологических объектов – мишеней для действия токсикантов и других биологически активных низкомолекулярных веществ.

Так, описано получение комплексов на основе ДНК и полиаллиламин гидрохлорида (ПАН), полидиаллилдиметиламмоний хлорида (PDDA) и полистиролсульфоната (PSS) методом послойной электростатической иммобилизации компонентов [1, 3, 4]. С помощью циклической вольтамперометрии и измерения электрохимического импеданса установлена проницаемость пленок для неорганических ионов – носителей заряда, а также стабильность характеристик полиэлектролитных комплексов при хранении. ДНК-сенсоры на основе полиэлектролитных комплексов ДНК нашли применение при определении компле-

ментарных нуклеотидных последовательностей [5, 6], для регистрации повреждения ДНК [7, 8] и включения в состав поверхностного слоя углеродных нанотрубок [9, 10] и наночастиц металлов [11–13]. Показано, что полиэлектролитные комплексы улучшают операционные характеристики ДНК-сенсоров за счет подавления неспецифической адсорбции мешающих компонентов пробы, повышения регулярности строения поверхностного биочувствительного слоя и уменьшения стерических препятствий для взаимодействия ДНК с определяемыми соединениями.

Вместе с тем одной из проблем использования в составе биосенсоров полиэлектролитных комплексов является их низкая адгезия ко многим материалам, применяемым в качестве преобразователей сигнала. Резкое изменение концентрации электролитов в процессе измерения или присоединение массивных молекул белков или полинуклеотидов, присутствующих в пробе, может приводить к отслаиванию полиэлектролитного слоя и утрате работоспособности биосенсора. В случае импедиметрических сенсоров, помимо отслаивания, на сигнал может влиять поступление низкомолекулярных ионов между слоями полиэлектролитов, снижающее чувствительность регистрации процессов с участием ДНК.

Одним из способов повышения устойчивости полиэлектролитных комплексов в составе электрохимических ДНК-сенсоров является сочетание технологии электрополимеризации и электростатической самосборки. Первый слой формируется на электроде в результате осаждения олигомерных продуктов полимеризации, несущих, как правило, положительный заряд. Последующие слои удерживаются силами электростатического притяжения, как и в случае традиционных полиэлектролитных комплексов. Перспективность подобного подхода подтверждена созданием ДНК-сенсоров на основе электродов, модифицированных полипирролом и полифенотиазинами [14–16]. Показано, что введение в состав биочувствительного слоя полимера повышает его емкость в отношении ДНК, аккумулируемых на поверхности, а также чувствительность регистрации гибридизации и взаимодействий ДНК-белок. Однако в таких работах использовали бинарные слои, состоящие из электрополимеризованной пленки поликатиона и ДНК. Кроме того, для удержания олигонуклеотидов в составе поверхностного слоя в дополнение к электростатическим взаимодействиям использовали авидин-биотиновое связывание и ковалентную пришивку посредством карбодимидов. Это не позволяет оценить, насколько электрополимеризация как способ формирования полиэлектролитных слоев способна влиять на стабильность получаемых многослойных покрытий. В настоящей работе изучены характеристики электрохимического импеданса полиэлектролитных покрытий, полученных с участием ДНК и синтетических полиэлектролитов на электродах, модифицированных электрополимеризованным фенотиозиновым красителем метиленовым синим (МС).

## 1. Экспериментальная часть

**1.1. Материалы и реактивы.** В работе использовали ДНК из спермы лосося, PSS, PАН («Sigma-Aldrich», Германия, Великобритания), глутаровый альдегид («Lancaster», Англия), МС, NaOH, пероксид водорода (30%-ный водный раствор, «Экофарм», Казань), ферроцианиды калия  $K_3[Fe(CN)_6]$  и  $K_4[Fe(CN)_6]$

(Михайловский завод химреактивов), ЭДТА,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  («Реахим»), аскорбиновую кислоту («Люми», Екатеринбург), SYBR GREEN I (DNA-synthesis, Россия).

Вольтамперометрические измерения проводили в 0.1 М фосфатном буферном растворе, pH 7.5, на фоне 0.2 М сульфата натрия. Импедиметрические измерения проводили в 0.1 М фосфатном буферном растворе в присутствии 0.01 М растворов  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  и  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . Все рабочие растворы готовили путем растворения точной навески вещества в дистиллированной воде и использовали в течение дня.

**1.2. Приборы и методы эксперимента.** Электрохимические и импедиметрические измерения проводили с помощью потенциостата AUTOLAB PGSTAT 302 («EcoChemie», Нидерланды), оснащенного модулем FRA2. В качестве рабочего электрода использовали стеклоуглеродный электрод  $0.018 \text{ см}^2$ . Противозлектродом служила платиновая проволока, электродом сравнения – хлоридсеребряный электрод  $\text{Ag}/\text{AgCl}/3.5 \text{ М КCl}$  («EcoChemie»). Все измерения проводили в трехэлектродной ячейке объемом 5 при  $22 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Для обработки данных электрохимического эксперимента использовали программное обеспечение «EcoChemie» GPES (циклическая вольтамперометрия), FRA и NOVA 1.4 (импедиметрия). Контроль величины pH рабочих растворов проводили с помощью pH-метра «Эксперт-001» («Эконикс-Эксперт», Москва).

Эпифлуоресцентные изображения получали при помощи микроскопа Carl Zeiss AxioScore A1, оснащенного видеокамерой AxioCam MRc5, с использованием объектива  $20\times$  (числовая апертура 0.5). Для возбуждения флуоресценции использовали синий фильтр (488 нм).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ Microcal Origin 8.0.

**Электрополимеризация МС.** Рабочую поверхность стеклоуглеродного электрода механически полировали оксидом алюминия, далее очищали электрохимически путем многократного циклирования потенциала в рабочем буферном растворе. После этого в ячейку, содержащую 4.5 мл фосфатного буферного раствора, pH 7.5, добавляли 500 мкл 0.02 М раствора МС и регистрировали 30 циклов сканирования потенциала в диапазоне от  $-700$  до  $1100 \text{ мВ}$  при скорости развертки  $100 \text{ мВ/с}$  (циклические вольтамперограммы приведены на рис. 1, а). После полимеризации поверхностную пленку стабилизировали. Для этого электрод переносили в фосфатный буферный раствор, не содержащий мономера МС, и проводили 15-кратное циклирование потенциала в диапазоне от  $-500$  до  $500 \text{ мВ}$  при скорости развертки  $100 \text{ мВ/с}$ . Затем электрод выдерживали в том же буферном растворе при  $400 \text{ мВ}$  в течение 1 мин, промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Циклические вольтамперограммы, получаемые в процессе стабилизации, приведены на рис. 1, б.

**Модификация электрода полиэлектролитным комплексом.** После модификации электрода слоем электрополимеризованным МС (поли-МС) на его поверхность наносили по 2 мкл растворов ДНК (1 мг/мл), PSS (1 мг/мл) и РАН (1 мг/мл). Раствор ДНК готовили растворением навески в 0.1 М фосфатном буферном растворе, pH 7.5, растворы PSS и РАН готовили путем растворения

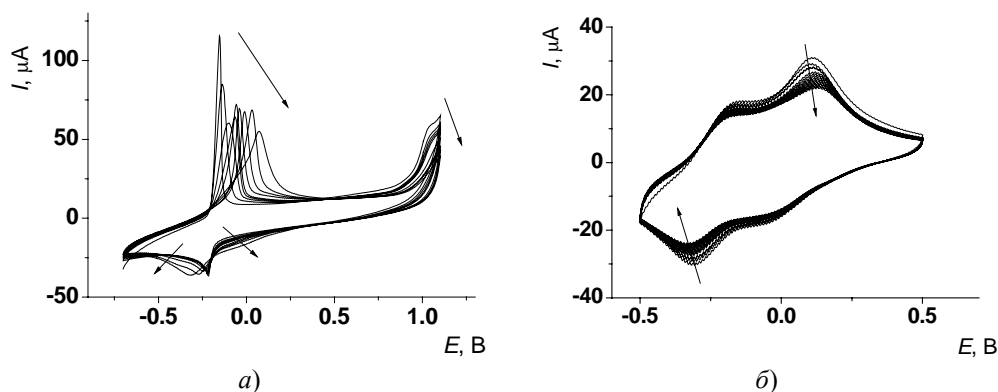


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные (а) на стеклоглеродном электроде в 2.0 мМ МС; (б) на стеклоглеродном электроде, покрытом электрополимеризованным МС, в фосфатном буферном растворе, рН 7.5. Скорость развертки 100 мВ/с. Изменения вольтамперных кривых в процессе циклирования обозначены стрелками (от 1-го цикла к 30-му для электрополимеризации и от 1-го цикла к 15-му при электрохимической стабилизации поверхностного слоя)

навесок в 0.5 М NaCl. Каждый слой высушивали при 30–40 °С. Состав полученных полиэлектролитных комплексов приведен ниже:

1. поли-МС – PSS – PАН;
2. поли-МС – ДНК – PАН;
3. поли-МС – PSS – PАН – PSS;
4. поли-МС – PSS – PАН – ДНК;
5. поли-МС – ДНК – PАН – PSS.

Для получения эпифлуоресцентных изображений использовали печатные графитовые электроды, модифицированные аналогично стеклоглеродным электродам. Для окраски электродов на их рабочую поверхность наносили 2 мкл красителя SYBR GREEN I, через 5 мин электрод промывали водой и высушивали при комнатной температуре.

**Импедиметрические измерения.** Измерение электрохимического импеданса проводили в присутствии эквимолярной смеси 0.01 М  $K_3[Fe(CN)_6]$  и  $K_4[Fe(CN)_6]$  при 0.11 В (формальный потенциал редокс-пары  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ ) в интервале частот от 100 кГц до 0.04 Гц с амплитудой напряжения 5 мВ с помощью модуля FRA2 потенциостата AUTOLAB PGSTAT 302. Далее полученные данные обрабатывали с помощью пакета программ NOVA 1.4 с использованием эквивалентной схемы R(RC)(RC).

**Приготовление реактива Фентона.** Смешивали растворы 0.8 мМ ЭДТА, 2 М NaOH и 0.1 мМ  $FeSO_4$ . Непосредственно перед использованием к полученной смеси добавляли растворы 4 мМ аскорбиновой кислоты и 0.1 мМ  $H_2O_2$ . При контроле окислительного повреждения ДНК электроды инкубировали в реактиве Фентона в течение 5 и 10 мин.

## 2. Результаты и их обсуждение

**2.1. Характеристика многослойных полиэлектролитных покрытий электродов.** Для включения нативной ДНК в состав полиэлектролитных комплексов использовали синтетические полиэлектролиты – PАН и PSS, которые ранее с успехом использовали для получения аналогичных модифицирующих слоев с включением углеродных нанотрубок и живых клеток дрожжей [17]. Промежуточное высушивание каждого наносимого слоя позволяет уменьшить расстояние между носителями заряда, что, в свою очередь, позволяет получить устойчивые покрытия с воспроизводимыми характеристиками. О включении ДНК в состав полимерного слоя можно судить по эпифлуоресцентным изображениям, полученным после инкубирования электрода в растворе красителя SYBR Green I, демонстрирующего высокое сродство к нативной ДНК [18]. По сравнению с широко применяемым этидий бромидом для получения изображений комплексов ДНК – SYBR Green I не требуется потенциально опасного ультрафиолетового излучения, флуоресценция возбуждается при помощи стандартного синего фильтра. Изображения пленок, содержащих ДНК (полиэлектролитный комплекс **4**), после контакта с SYBR Green I, представлены на рис. 2. Интенсивная флуоресценция поверхности электрода указывает на наличие молекул нативной ДНК в составе пленок. Для сравнения показаны изображения электрода, модифицированного комплексом **3**, содержащим то же количество слоев, но с PSS вместо ДНК. Таким образом, использование полиэлектролитов позволяет удерживать молекулы ДНК в составе поверхностного слоя без ковалентной пришивки.

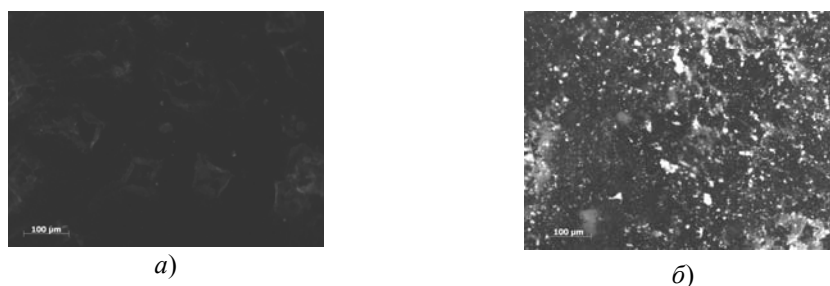


Рис. 2. Эпифлуоресцентные изображения комплексов **3** (а) и **4** (б) на поверхности печатного графитового электрода после 5 мин инкубирования в растворе красителя SYBR Green I. Увеличение 200×

Для характеристики полиэлектролитных комплексов использовали измерение электрохимического импеданса. Для этого в раствор добавляли эквимольную смесь феррицианидов калия (II/III). Измерения проводили при формальном равновесном потенциале феррицианида, равном полусумме потенциалов пика окисления и пика восстановления. Установлено, что нанесение полиэлектролитных комплексов поверх слоя поли-МС не приводит к значительному изменению морфологии вольтамперных кривых, которые представляют собой пару симметричных совмещенных пиков окисления/восстановления, отвечающих переносу одного электрона. Величина разности потенциалов пиков окисления/восстановления  $\Delta E = 150$  мВ соответствует квазиобратимому переносу электрона и практически

не меняется при переходе от поли-МС к комплексам 1, 2 (три слоя) и 3–5 (четыре слоя). Это говорит об отсутствии специфических взаимодействий между редокс-маркером и ДНК, а также о невозможности аккумуляции ферроцианидов между полиэлектролитами. О том же говорит обратимость сигнала на циклических вольтамперограммах при разнонаправленном изменении концентрации ферроцианидов ( $1 \cdot 10^{-3} \div 1 \cdot 10^{-5} \div 1 \cdot 10^{-3}$  М). Потенциометрические измерения потенциала поли-МС в растворах  $K_3[Fe(CN)_6]$  и  $K_3[Fe(CN)_6]$ , взятых в мольном отношении от 1 : 4 до 4 : 1, показали, что окислительно-восстановительные превращения электрополимеризованного слоя протекают с переносом одного электрона и являются обратимыми в выбранных условиях измерения сигнала. Нанесение 2–4 слоев заряженных полиэлектролитов незначительно влияет на обратимость электронного переноса. Расчеты по методу Лавирона [19] дали значение экспериментальной константы скорости переноса электрона  $k_s = 0.34 \text{ с}^{-1}$ , что подтверждает вывод об обратимости электронного переноса и возможности проведения измерения электрохимического импеданса. Вместе с тем величина формального редокс-потенциала  $E = 0.11 \text{ В}$  оказалась меньше значения, регистрируемого на платиновом или стеклоуглеродном электродах ( $E = 0.22\text{--}0.24 \text{ В}$ ), что может служить косвенным свидетельством облегчения переноса электрона за счет электростатического взаимодействия положительно заряженного поли-МС и отрицательно заряженных ионов ферроцианида.

На рис. 3 приведены диаграммы Найквиста, показывающие зависимость активной и мнимой частей сопротивления при различных частотах генерирующего потенциала. Для расчетов использовали две эквивалентные схемы. Модель А отражает перенос заряда на границе электрод – раствор, модель Б учитывает процессы на внутренней (электрод – полиэлектролитный комплекс) и внешней (полиэлектролитный комплекс – раствор) границах раздела фаз. Значением сопротивления Варбурга  $Z_W$  пренебрегали.

Полукруг в области высоких частот отвечает лимитирующей стадии переноса заряда, сопротивление переноса заряда определяется исходя из радиуса окружности. Для модели Б на диаграмме Найквиста присутствуют две искаженные полуокружности, отвечающие процессам на различных сторонах поверхностного слоя. Меньшая полуокружность соответствует внутренней границе раздела и меньшим значениям сопротивления. Вторая часть графиков (при меньших значениях частоты) аппроксимируется прямой линией. Она отвечает лимитирующему контролю диффузионного переноса заряда.

Результаты измерения электрохимического импеданса приведены в табл. 1. Они позволяют оценить вклад ДНК и строения полиэлектролитного комплекса в характеристики переноса заряда. Относительная погрешность определения указанных значений в серии из шести измерений не превышала 10 отн. %.

В рамках модели А обращает на себя внимание значительное увеличение разделения заряда для комплекса 2, в котором слой ДНК экранирован положительно заряженным РАН. Можно сделать вывод, что нативная ДНК обладает значительной плотностью отрицательного заряда, который не компенсируется собственным зарядом поли-МС и РАН. В результате замена PSS на ДНК приводит к увеличению разделения заряда, а значит, и емкости поверхностного слоя.

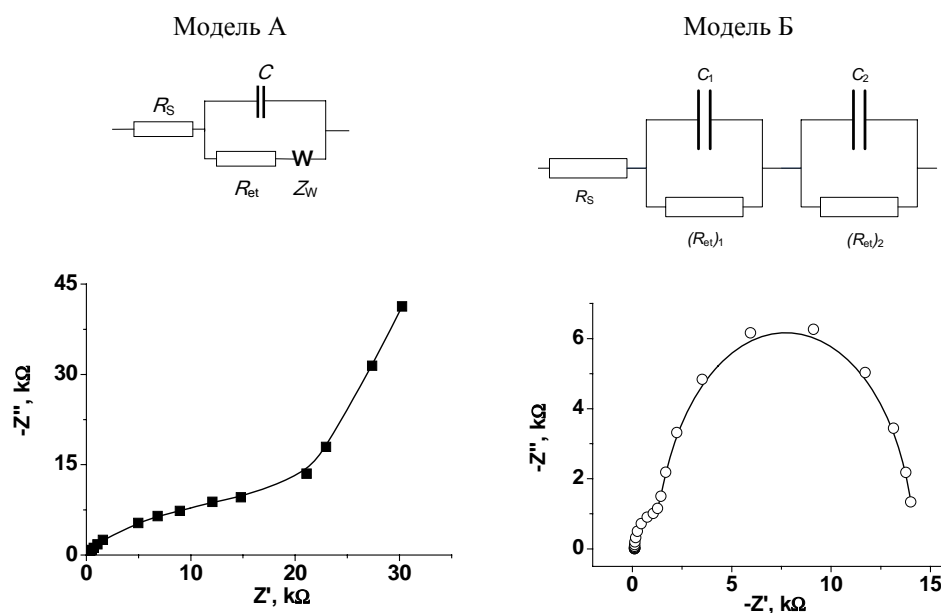


Рис. 3. Эквивалентные схемы и соответствующие им диаграммы Найквиста, полученные на стеклоуглеродном электроде, модифицированном полиэлектролитным комплексом 4. 0.01 М  $K_3[Fe(CN)_6]$ , 0.01 М  $K_4[Fe(CN)_6]$ . Сплошные линии соответствуют аппроксимации экспериментальных данных.  $R_s$  – диффузионное сопротивление переноса маркера,  $R_{et}$  – сопротивление переноса заряда,  $C$  – емкость границы раздела. Измерения при 0.235 В отн. Ag/AgCl. Частота 0.04 Гц – 100 кГц, амплитуда 5 мВ

Табл. 1

Характеристики электрохимического импеданса полиэлектролитных комплексов на стеклоуглеродных электродах, покрытых электрополимеризованным слоем поли-МС

Комплекс	Модель А		Модель Б			
	$R_{et}$ , кОм	$C$ , мкФ	$(R_{et})_1$ , кОм	$C_1$ , мкФ	$(R_{et})_2$ , кОм	$C_2$ , мкФ
1	23.5	4.5	2.6	3.2	24.6	3.37
2	13.7	45.0	3.2	22.2	10.3	46.8
3	20.9	3.9	2.5	32.86	19.9	26.8
4	22.0	3.6	1.7	2.08	14.8	2.1
5	17.7	4.8	1.6	1.35	10.8	2.5

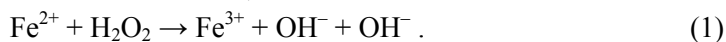
Изменение сопротивления переноса заряда меняется антибатно емкости двойного слоя: увеличение емкости сопровождается снижением сопротивления и наоборот. Сопротивление переноса заряда в целом оказалось менее чувствительным к составу полиэлектролитного комплекса, чем емкость, что подтверждает литературные данные [1, 3] о том, что полиэлектролитные комплексы не создают диффузионного торможения переноса небольших неорганических ионов. Все найденные значения с учетом 10%-ной погрешности измерения, за исключением слоя 2, совпадают.

В рамках модели Б получены небольшие значения сопротивления переноса заряда на границе электрод – полиэлектролит. Это согласуется с высказанным

ранее предположением о том, что поли-МС участвует в переносе электрона и не снижает обратимости окисления-восстановления ферроцианид-иона. Найденные значения сопротивления переноса заряда на внешней границе раздела практически совпадают со значениями, установленными для всего слоя по упрощенной модели А.

Интересно сопоставление результатов оценки параметров импеданса по модели А и Б. В целом они согласуются между собой, при этом наибольший вклад в изменение емкости вносит разделение заряда на внешней границе раздела. Однако для комплекса **З**, в котором ДНК отсутствует, значение емкости внешней границы раздела оказалось весьма значительным. Можно предположить, что внедрение ДНК во внутренние слои полиэлектролитного комплекса меняет распределение заряда в поверхностной пленке, что облегчает взаимодействие редокс-индикатора с комплексами, содержащими внешний отрицательно заряженный слой. Обращает на себя внимание также отсутствие значимого различия в поведении комплексов, отличающихся по заряду внешнего слоя (РАН или PSS). По-видимому, влияние ДНК с высокой концентрацией заряда является определяющим для переноса ферроцианид-иона, компенсируя и различия в диффузионной проницаемости, и изменение заряда на границе раздела фаз.

**2.2. Моделирование окислительного повреждения ДНК.** Для оценки возможности контроля повреждения ДНК по характеристикам электрохимического импеданса полиэлектролитных комплексов была использована модельная система генерирования радикалов гидроксида в реакции ионов железа(II) с пероксидом водорода (реактив Фентона [21]):



Реакцию проводили в щелочной среде в присутствии ЭДТА и аскорбиновой кислоты, добавляемых для регенерации восстановителя. Результаты измерений приведены в табл. 2.

Сравнение результатов, полученных до и после контакта электродов с реактивом Фентона, выявило две тенденции. Во-первых, окислительное повреждение ДНК увеличивает сопротивление переноса заряда вне зависимости от числа слоев и положения ДНК в составе комплекса. Эффект носит прогрессирующий характер и последовательно увеличивается с временем инкубирования (5 и 10 мин). Сопоставление данных моделей А и Б показывает, что вначале сопротивление переноса заряда возрастает на внешней границе раздела, но при увеличении времени контакта до 10 мин аналогичные изменения происходят на внутренней границе слоя. Изменения емкости носят менее регулярный характер. Превалирует уменьшение разделения заряда как для полислоного комплекса в целом (модель А), так и на границах раздела.

Можно предположить два возможных механизма влияния окислительного повреждения ДНК на характеристики электрохимического импеданса полислоного покрытия. С одной стороны, окисление ДНК должно несколько компенсировать ее отрицательный заряд и нарушать регулярность строения, что выражается в синхронном уменьшении сопротивления переноса заряда (менее плотный слой с более медленным диффузионным переносом ионов редокс-маркера) и емкости (уменьшение разделения заряда в слое, содержащем ДНК).



Табл. 2

Характеристики электрохимического импеданса полиэлектrolитных комплексов на стеклоугеродных электродах, покрытых электрополимеризованным слоем поли-МС, после контакта с реактивом Фентона

Комплекс	Модель А		Модель Б			
	$R_{et}$ , кОм	$C$ , мкФ	$(R_{et})_1$ , кОм	$C_1$ , мкФ	$(R_{et})_2$ , кОм	$C_2$ , мкФ
Инкубирование 5 мин						
2	16.3	27.8	3.3	3.2	12.9	16.0
4	24.84	48.2	3.2	3.6	24.2	53.9
5	25.13	42.5	5.6	2.6	26.2	47.3
Инкубирование 10 мин						
Комплекс	Модель А		Модель Б			
	$R_{et}$ , кОм	$C$ , мкФ	$(R_{et})_1$ , кОм	$C_1$ , мкФ	$(R_{et})_2$ , кОм	$C_2$ , мкФ
2	24.9	33.4	3.6	20.0	26.5	37.7
4	29.3	36.7	7.5	5.2	45.5	37.7
5	40.4	25.8	6.2	20.6	35.8	26.0

С другой стороны, может происходить процесс частичной деградации поли-МС, аналогично анодному разрушению полимера, происходящему при высоких анодных потенциалах. Окисление снижает эффективность медиаторного переноса электрона, а также, возможно, и положительный заряд полимерного слоя. Это объясняет увеличение переноса заряда, наблюдаемое в полиэлектrolитных комплексах **1** и **3**, не содержащих ДНК, при продолжительности контакта 10 мин. Сопротивление возрастает в 1.5–2.1 раза при сохранении или незначительном изменении параметров импеданса на внешней границе раздела.

Результаты измерения повреждения ДНК могут быть искажены процессами аккумуляции ионов железа или их комплексов с ЭДТА в пределах поверхностного слоя. Для учета этого были поставлены эксперименты с обработкой электродов реактивом Фентона и последующей отмывкой продуктов реакции в буферном растворе. Усложнение процедуры увеличило погрешность измерения параметров импеданса, что не позволило сделать выводы о наличии такого влияния. Возможно, в последующем следует использовать другие ДНК-повреждающие факторы, такие, как комплексы рутения и кобальта или действие ультрафиолетового излучения для более полной характеристики изменений полиэлектrolитных комплексов. Тем не менее проведенные исследования показали характеристические изменения параметров импеданса (синхронное увеличение сопротивления переноса заряда и снижение емкости поверхностного слоя), которые в перспективе могут найти применение для обнаружения мутагенных факторов в объектах контроля.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации по поддержке молодых ученых-кандидатов наук (МК-249.2009.3) и РФФИ (проекты № 08-03-00161-а, 09-04-05079-б).

### Summary

*A.V. Porfireva, V.B. Kostyleva, A.I. Zamaleeva, G.A. Evtugyn, R.F. Fakhrullin, V.Z. Latsypova.* Biosensors Based on Polyelectrolyte DNA Complexes and Electropolymerized Materials.

The article studies the influence of the composition of the complexes based on DNA and synthetic polyelectrolytes, which are obtained by electrostatic self-assembling on the electropolymerized Methylene Blue layer, on the characteristics of electrochemical impedance. It was shown, that the position of DNA in the polyelectrolyte complex exerted maximal effect on the resistance of the charge transfer and the capacity of the surface layer. Changes of the impedance characteristics initiated by the damage of the DNA molecules by Fenton reagent were specified. The possibility of registration of the characteristic changes in the resistance of the charge transfer and the layer capacity for the detection of the DNA damaging factors was established.

**Key words:** DNA sensor, polyelectrolyte complex, electrochemical impedance, DNA damaging factors.

### Литература

1. Lvov Yu., Decher G., Sukhorukov G. Assembly of thin films by means of successive deposition of alternate layers of DNA and poly(allylamine) // *Macromolecules*. – 1993. – V. 26. – P. 5396–5399.
2. Pei R., Cui X., Yang X., Wang E. Assembly of alternating polycation and DNA multilayer films by electrostatic layer-by-layer adsorption // *Biomacromolecules*. – 2001. – V. 2. – P. 463–468.
3. Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials / Eds. G. Decher, J. Schlenoff. – Weinheim: Wiley-VCH, 2003. – 543 p.
4. Luo L., Liu J., Wang Z., Yang X., Dong S. Wang E. Fabrication of layer-by-layer deposited multilayer films containing DNA and its interaction with methyl green // *Biophys Chem*. – 2001. – V. 94. – P. 11–22.
5. Wang Q., Yang X., Wang K. Enhanced surface plasmon resonance for detection of DNA hybridization based on layer-by-layer assembly films // *Sensors Actuators B*. – 2007. – V. 123. – P. 227–232.
6. Du M., Yang T., Zhang Y., Jiao K. Sensitively electrochemical sensing for sequence-specific detection of phosphinothricin acetyltransferase gene: layer-by-layer films of poly-L-lysine and Au-carbon nanotube hybrid // *Electroanalysis*. – 2009. – V. 21. – P. 2521–2526.
7. Zhou L., Yang J., Estavillo C., Stuart J.D., Schenkman J.B., Rusling J.F. Toxicity screening by electrochemical detection of DNA damage by metabolites generated in situ in ultrathin DNA-enzyme films // *J. Am. Chem. Soc.* – 2003. – V. 125. – P. 1431–1436.
8. Mugweru A., Wang B., Rusling J. Voltammetric sensor for oxidized DNA using ultrathin films of osmium and ruthenium metallopolymers // *Anal. Chem.* – 2004. – V. 76. – P. 5557–5563.
9. He P., Bayachou M. Layer-by-layer fabrication and characterization of DNA-wrapped single-walled carbon nanotube particles // *Langmuir*. – 2005. – V. 21. – P. 6086–6092.
10. Ma H., Zhang L., Pan Y., Zhang K., Zhang Y. A novel electrochemical DNA biosensor fabricated with layer-by-layer covalent attachment of multiwalled carbon nanotubes and gold nanoparticles // *Electroanalysis*. – 2008. – V. 20. – P. 1220–1226.
11. Li J., Xue M., Wang H., Cheng L., Gao L., Lu Z., Chan M. Amplifying the electrical hybridization signals of DNA array by multilayer assembly of Au nanoparticle probes // *Analyst*. – 2003. – V. 128. – P. 917–923.
12. Zhang K., Ma H., Zhang L., Zhang Y. Fabrication of a sensitive impedance biosensor of DNA hybridization based on gold nanoparticles modified gold electrode // *Electroanalysis*. – 2008. – V. 20. – P. 2127–2133.

13. *Chen S.-H., Chuang Y.-C., Lu Y.-C., Lin H.-C., Yang Y.-L., Lin C.-S.* A method of layer-by-layer gold nanoparticle hybridization in a quartz crystal microbalance DNA sensing system used to detect dengue virus // *Nanotechnology*. – 2009. – V. 20. – P. 215501-1–P. 215501-10.
14. *Pruneanu S., Al-Said S.A.F., Dong L., Hollis T.A., Galindo M.A., Wright N.G., Houlton A., Horrocks B.R.* Self-assembly of DNA-templated polypyrrole nanowires: spontaneous formation of conductive nanoropes // *Adv. Funct. Mater.* – 2008. – V.18. – P. 2444–2454.
15. *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.
16. *Baur J., Gondran C., Hozinger M., Defrangq E., Perrot H., Cosnier S.* Label-free femtomolar detection of target DNA by impedimetric DNA sensor based on poly(pyrrole-nitrilotriacetic acid) film // *Anal. Chem.* – 2010. – V. 82. – P. 1066–1072.
17. *Zamalieva A.I., Sharipova I.R., Porfireva A.V., Evtugyn G.A., Fakhrullin R.F.* Polyelectrolyte-mediated assembly of multiwalled carbon nanotubes on living yeast cells // *Langmuir*. – 2010. – V. 26. – P. 2671–2679.
18. *Singer V.L., Lawlor T.E., Yue S.* Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test) // *Mutation Res.* – 1999. – V. 439. – P. 37–47.
19. *Bard A.J., Faulkner L.R.* *Electrochemical Methods: fundamentals and applications*. – N. Y.: John Wiley & Sons, 1980. – 736 p.
20. *Freger V.* Diffusion impedance and equivalent circuit of a multilayer film // *Electrochem. Commun.* – 2005. – V. 7. – P. 957–961.
21. *Henle E.S., Linn S.* Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – P. 19095–19098.

Поступила в редакцию  
29.03.10

---

**Порфирьева Анна Вениаминовна** – кандидат химических наук, научный сотрудник отдела аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [porfireva-a@inbox.ru](mailto:porfireva-a@inbox.ru)

**Костылева Вероника Борисовна** – аспирант кафедры прикладной экологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [Veronika1287@yandex.ru](mailto:Veronika1287@yandex.ru)

**Замалиева Алсу Ильгизовна** – аспирант кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [alsu130ksu@mail.ru](mailto:alsu130ksu@mail.ru)

**Евтюгин Геннадий Артурович** – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [Gennady.Evtugyn@ksu.ru](mailto:Gennady.Evtugyn@ksu.ru)

**Фахруллин Равиль Фаридович** – кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [biosensor@bk.ru](mailto:biosensor@bk.ru)

**Латыпова Венера Зиннатовна** – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой прикладной экологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: [Venera.Latypova@ksu.ru](mailto:Venera.Latypova@ksu.ru)