

УДК 577.113.7

## ДНК-ПЕРОКСИДАЗНЫЙ КОНЬЮГАТ. ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И ИММОБИЛИЗАЦИЯ НА ПОВЕРХНОСТИ СТЕКЛОУГЛЕРОДНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ

*Т.И. Абдуллин, В.Г. Винтер, М.В. Коландинская, Г.А. Евтюгин,  
Г.К. Будников*

### Аннотация

Разработан способ получения конъюгата пероксидазы (ПХ) и молекулы ДНК с использованием глутарового альдегида. Изучено влияние условий на эффективность образования и стабильность конъюгата. Исследованы каталитические характеристики ПХ в составе конъюгата, влияние специфических ингибиторов и активаторов. Результаты показали изменение свойств ПХ, иммобилизованной на молекуле ДНК, по сравнению со свободным ферментом. Предложены различные способы иммобилизации конъюгата ДНК-ПХ на стеклоуглеродных электродах, модифицированных полимерными матрицами. Изучены рабочие характеристики сенсора, включающие зависимость сигнала от времени, концентрации субстрата, нагрузки конъюгата, используя индикаторную пероксидазную реакцию с гидрохиноном.

### Введение

В настоящее время наблюдается активное развитие электрохимических сенсоров на основе молекул ДНК и их аналогов. Область применения таких сенсоров различна. Разработаны различные методы гибридизационного анализа с использованием электрохимических преобразователей сигнала. Процесс гибридизации ДНК-зонда, иммобилизованного на электроде, и ДНК-мишени может контролироваться по изменению сигнала окисления гуанина или с использованием электрохимически активных индикаторов, взаимодействующих с образующимся дуплексом ДНК [1]. Широкое применение при создании гибридизационных сенсоров находит конъюгация ДНК-зондов с различными метками, генерирующими электрохимический сигнал: производными ферроцена [2], наночастицами и комплексами металлов [3] или ферментами [4].

Другим направлением развития электрохимических ДНК-сенсоров является их использование для изучения взаимодействия низкомолекулярных соединений с ДНК. Это может дать ценную информацию об аффинности взаимодействий и их влиянию на окисление пуриновых оснований. Полученная информация позволяет выявлять соединения, способные приводить к повреждению ДНК, и таким образом участвовать в развитии генетических нарушений и канцерогенезе. [5, 6] Значительный интерес также представляет определение с помощью различных электрохимических методов белков, взаимодействующих с ДНК [7], в том числе специфических антител к ДНК [8].

Одной из задач при создании биосенсоров является получение чувствительного биослоя, пространственно объединяющего различные биомолекулы. С этой целью часто применяется конъюгация нуклеиновых кислот с ферментами [9] или создание многокомпонентных мембран, содержащих ДНК и фермент [10–13]. В частности, совместная иммобилизация ДНК и цитохромов позволила создать электрохимический сенсор для определения токсичных соединений, образующихся в процессе ферментативной трансформации некоторых ксенобиотиков [10]. Большое количество работ посвящено изучению прямого переноса электронов на активный центр гем-содержащих ферментов, протекающего с участием ДНК. Данное свойство может быть использовано для безреагентного определения пероксида водорода [11, 12] или изучения взаимодействия цитохромов с ДНК [13].

Представляет интерес получение ковалентно связанного конъюгата молекулы ДНК и ПХ для последующего использования в составе электрохимических сенсоров. Такой конъюгат характеризуется пространственным сближением полинуклеотидного и ферментного компонентов, что позволяет изучать влияние низкомолекулярных эффекторов и белков на активность ПХ, используемой для генерирования аналитического сигнала. Простым и эффективным способом получения конъюгата ДНК-ПХ является кросс-сшивка с помощью глутарового альдегида. Известно, что глутаровый альдегид реагирует с аминокеттогруппами с образованием относительно стабильных азометиновых связей (оснований Шиффа). Связывание нуклеиновых кислот происходит по гетероциклическим азотистым основаниям, имеющим первичные аминокеттогруппы (аденин, гуанин, цитозин) [14, 15]. В случае дунитевых препаратов ДНК взаимодействие происходит, по-видимому, с одноцепочечными участками, связанными с дефектами структуры.

### 1. Экспериментальная часть

В работе использовали ДНК эритроцитов цыплят высокий полимер (Reanal, Венгрия), ПХ, 450 ед./мг (КФ 1.11.1.7, Serva, Heidelberg), глутаровый диальдегид (Lancaster, Англия), хитозан (10000 Да, Усть-Хайрюзовский рыбоперерабатывающий завод). Хитозан дополнительно очищали переосаждением из раствора в ледяной уксусной кислоте. Для модификации электродов также использовали свежеперегнаный анилин (Реахим), нафион (Aldrich, Germany) и поли-L-лизин ( $n = 40-60$ , Serva, Heidelberg).

ДНК денатурировали, инкубируя раствор на кипящей водяной бане 15 мин. и затем сразу помещая в ледяную баню на 30 мин. Конъюгат получали из реакционной смеси, содержащей 0.2–0.8 мг/мл нативной или денатурированной ДНК, 0.25–1.5 мг/мл ПХ и 1% глутаровый альдегид. Смесь выдерживали 1–2 ч при комнатной температуре и далее в нее добавляли глицин до конечной концентрации 0.05 М для связывания свободных альдегидных групп. Раствор при этом приобретал зеленоватую окраску. Продукты реакции разделяли методом гель-фильтрации на акрилексе П-150. Хроматографирование проводили на колонке высотой 40 см и диаметром 1.4 см при 4°C, скорость элюирования составляла 20 мл/ч. Концентрацию ДНК в элюате измеряли спектрофотометрически при  $\lambda = 260$  нм. Содержание в элюате ПХ определяли фотометрически по

накоплению продукта каталитического превращения *o*-дианизидина (концентрация 0.016 мг/мл,  $\epsilon = 30 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$  [16]) в 0.1 М фосфатном буферном растворе, pH 7.0. За единицу пероксидазной активности принимали количество фермента, окисляющее 1 мкмоль субстрата за 1 мин.

Горизонтальный электрофорез проводили в 0.7 % агарозном геле (LKB, Швеция) на пластинах размером 10×10×3 мм при 4.0 мА/см. Окрашивание полос осуществляли растворами этидия бромид (2 мкг/мл) и 0.5 % кумасси.

Электрохимические измерения проводили с помощью компьютеризированного вольтамперографа «Экотест-ВА» (ООО «Эконикс-Эксперт», Москва) в режиме линейной постоянноточковой вольтамперометрии. Электродом сравнения служил хлоридсеребряный электрод, противоэлектродом – никелевая фольга, рабочим электродом – стеклоуглеродный электрод с диаметром рабочей поверхности 1 мм. Измерения проводили в буферных растворах, содержащих 0.1 М хлорид натрия в качестве фонового электролита, в ячейке объемом 10 мл. Скорость разверстки потенциала составляла 150 мВ/с.

Рабочие электроды перед работой подвергали полировке и промывали ацетоном. Модификацию электродов осуществляли следующим образом: 2 мкл 0.5% раствора хитозана в 1% уксусной кислоте или 2 мкл 0.1% спиртового раствора нафiona наносили на рабочую поверхность электрода с последующим высушиванием при комнатной температуре. Электроды, модифицированные хитозаном, дополнительно сушили при 50°C 15–20 мин. для образования стабильной пленки. Электроды, модифицированные нафионом, инкубировали в растворе полилизина (1 мг/мл) или сульфата магния (0.1 М) 10 мин. и ополаскивали дистиллированной водой для удаления несвязавшегося компонента. Электрополимеризацию анилина на поверхности рабочих электродов осуществляли циклированием потенциала от –200 до +1200 мВ в 0.1 М растворе анилина в 0.2 М серной кислоте при скорости разверстки потенциала 100 мВ/с. Сорбцию конъюгата на поверхности модифицированных и немодифицированных электродов проводили, нанося 2 мкл раствора конъюгата (концентрация ДНК в конъюгате составляла 4.4 мкг/мл) и высушивая 15 мин. при 37°C. После этого электроды отмывали при перемешивании в рабочем буферном растворе в течение 10 мин. Электрохимические измерения проводили при комнатной температуре.

## 2. Результаты и обсуждение

**Получение конъюгата ДНК-ПХ.** Об эффективности процесса образования конъюгата ДНК-ПХ судили по изменению активности фермента в процессе реакции. Как было установлено, в нейтральных и слабокислых буферных средах (фосфатный, ацетатный буферные растворы), а также в дистиллированной воде наблюдалось заметное уменьшение активности ПХ на протяжении реакции с глутаровым альдегидом (рис. 1). Предположение, что наблюдаемая инактивация фермента происходит в результате его связывания с ДНК, подтверждается контрольным экспериментом, в котором уменьшение активности фермента в тех же условиях в отсутствие ДНК было значительно ниже. Реакция также замедлялась в присутствии ионов магния (0.005 М), которые предположительно препятствуют взаимодействию ДНК с глутаровым альдегидом (рис. 2).

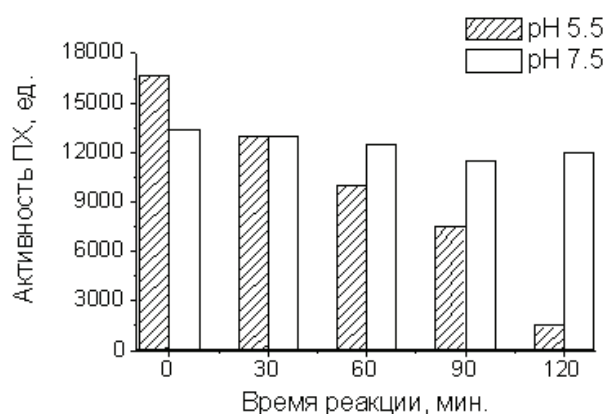


Рис. 1. Влияние pH на связывание ДНК и ПХ

Инкубация нативной и денатурированной ДНК и ПХ с глутаровым альдегидом в слабощелочных буферных растворах (pH 7.2–7.5) не приводила к инактивации фермента и связыванию с ДНК (рис. 1). Вероятно, данный факт объясняется структурными особенностями молекулы ДНК в щелочной среде, а именно, сильным отрицательным зарядом молекулы, препятствующим доступу фермента или реагента к центрам связывания.

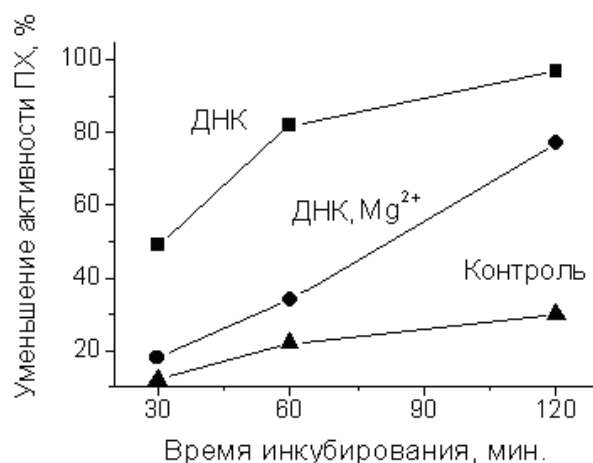


Рис. 2. Влияние присутствия ДНК и ионов Mg на уменьшение активности ПХ в реакции с глутаровым альдегидом

Результаты гель-хроматографии также показали отсутствие связывания ДНК и ПХ в слабощелочных растворах. Вид хроматограммы, полученной в этих условиях, не отличался от контроля (рис. 3, а). Элюирование контрольной смеси ДНК и ПХ (без глутарового альдегида) проводили в 0.01 М трис-НСl буферном растворе, pH 7.0. Полного разделения пиков ДНК и фермента добиться не удалось. Дополнительные хроматографические эксперименты показали наличие в коммерческом препарате ПХ высокомолекулярных белковых агрегатов с низкой пероксидазной активностью (данные не приведены).

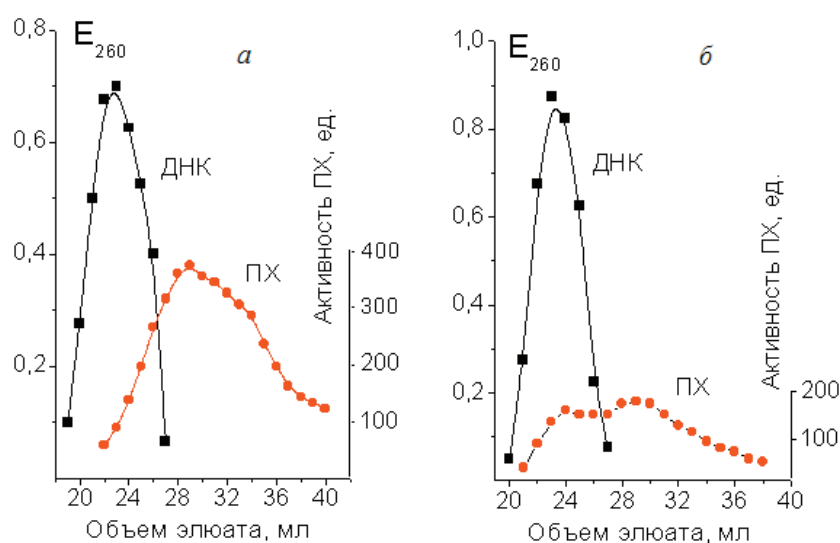


Рис. 3. Гель-хроматограмма ДНК и ПХ до (а) и после (б) инкубирования с глутаровым альдегидом

Хроматографическое разделение продуктов двух часовой инкубации ДНК и ПХ с глутаровым альдегидом в 0.01 М натрий-ацетатном буферном растворе, рН 5.5, показало наличие небольшого пика активности фермента в пике ДНК. Однако значительная инактивация фермента не позволяла сделать вывод об образовании конъюгата (рис. 3, б).

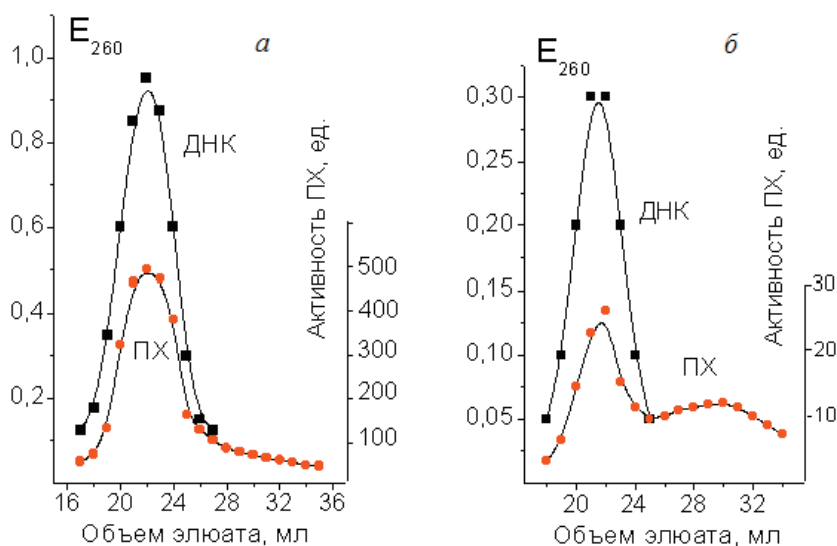


Рис. 4. Гель-хроматограмма (а) и рехроматограмма (б) конъюгата ДНК-ПХ

Для защиты активного центра ПХ в процессе кросс-сшивки в реакционный раствор был введен субстрат фермента гидрохинон (конечная концентрация 6 мМ). Добавление гидрохинона предотвращало инактивацию ПХ в процессе

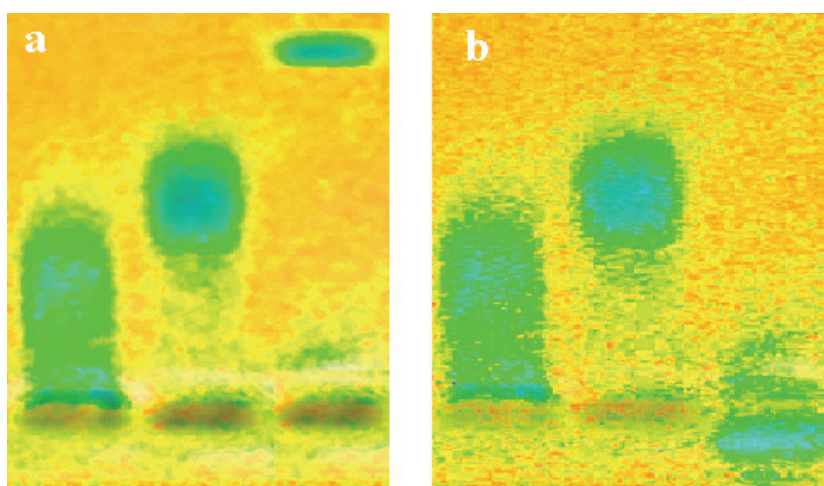


Рис. 5. Электрофорез продуктов конъюгации ДНК и ПХ в агарозном геле после окрашивания этидия бромидом (*a*) и кумасси (*b*)

связывания с ДНК. Хроматографические данные показали четко выраженный пик фермента в пике ДНК, при этом количество ПХ в элюате было пропорционально содержанию ДНК (рис. 4, *a*).

Для защиты активного центра ПХ в процессе кросс-сшивки в реакционный раствор был введен субстрат фермента гидрохинон (конечная концентрация 6 мМ). Добавление гидрохинона предотвращало инактивацию ПХ в процессе связывания с ДНК. Хроматографические данные показали четко выраженный пик фермента в пике ДНК, при этом количество ПХ в элюате было пропорционально содержанию ДНК (рис. 4, *a*).

Результаты электрофоретического разделения продуктов кросс-сшивки ДНК (нативной или денатурированной) и ПХ в агарозном геле также свидетельствуют об образовании ковалентного конъюгата. Так, в случае кросс-сшивки ПХ и денатурированной ДНК наблюдалось образование единственной полосы (рис. 5, центральная дорожка), проявляющейся при окрашивании этидий бромидом и кумасси. Данная полоса располагалась между полосой свободного фермента (оставшегося на старте) и денатурированной ДНК (наиболее удаленной от старта), инкубируемых в отсутствие глутарового альдегида (рис. 5, правая дорожка). Кросс-сшивка ПХ и нативной ДНК приводила к появлению двух полос, что, свидетельствует о наличии в препарате нативной ДНК частично денатурированных молекул. При этом электрофоретическая подвижность конъюгата, образующегося в результате связывания фермента с ДНК, зависела от степени ее денатурации (рис. 5, левая дорожка).

Полученный конъюгат оказался нестабильным в трис-НСI буферном растворе и полностью диссоциировал при повторной хроматографии на исходные компоненты в течение первых дней хранения. Однако, при хранении и элюировании конъюгата ДНК-ПХ в 0.01 М фосфатном буферном растворе, рН 5.5, его стабильность значительно возрастала (рис. 4, *b*, после 7 дней хранения при 4°C).

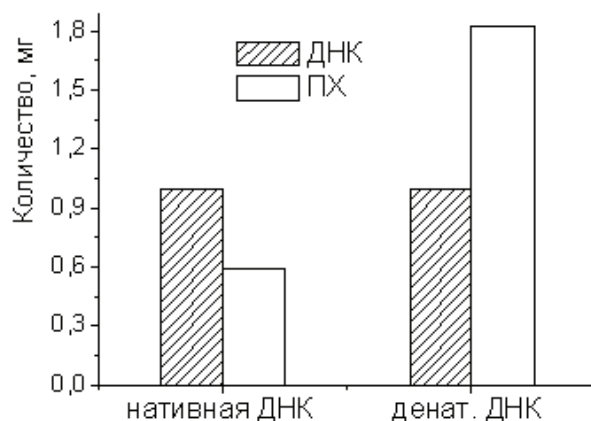


Рис. 6. Соотношение ДНК и ПХ в конъюгате, соответствующее максимальной нагрузке фермента

Были проведены эксперименты по изучению зависимости состава конъюгата от соотношения нативной/денатурированной ДНК и ПХ в реакционной смеси. Количество ДНК в конъюгате определяли спектрофотометрически при 260 нм, используя для нативной ДНК коэффициент экстинкции, равный  $0.02 \text{ (мл/мкг)}^{-1}$  [17]. Коэффициент экстинкции для денатурированной ДНК вычисляли, исходя из оптического поглощения раствора известной концентрации при 260 нм; он составил  $0.017 \text{ (мл/мкг)}^{-1}$ . Количество фермента определяли по вычисленной удельной активности в реакции с *o*-дианизидином.

Полученные результаты закономерно показали, что иммобилизация ПХ на денатурированной ДНК происходит более эффективно, чем на нативной ДНК, по причине лучшей доступности функциональных групп азотистых оснований для взаимодействия с глутаровым альдегидом. Так, оптимальное соотношение концентраций ДНК и фермента в реакционной среде составило соответственно  $0.41 \text{ мг} / 0.5 \text{ мг/мл}$  для нативной ДНК и  $0.21 \text{ мг} / 1.5 \text{ мг/мл}$  для денатурированной ДНК. Дальнейшее увеличение концентрации ПХ не приводило к существенному увеличению количества фермента в конъюгате. Кроме того, высокая концентрация ПХ в растворе могла приводить к нежелательному образованию олигомерных форм фермента. Соотношение компонентов в конъюгате, соответствующее максимальной нагрузке фермента, представлено на рис. 6.

Дальнейшие эксперименты проводили с конъюгатом денатурированной ДНК, так как данный конъюгат имел более однородный состав. Кроме того, нагрузка ПХ на денатурированной ДНК оказалась выше по сравнению с нативной ДНК, что теоретически лучше отвечает аналитическим задачам применения конъюгата в качестве компонента биосенсора, использующего ферментативную реакцию для генерирования аналитического сигнала. Для получения конъюгата реакционную смесь, содержащую денатурированную ДНК, ПХ, глутаровый альдегид и гидрохинон, инкубировали в течение 2 часов. После гель-хроматографии отбирали элюат, соответствующий максимальной концентрации ДНК и фермента, диализовали против бидистиллированной воды и лиофильно высушивали.

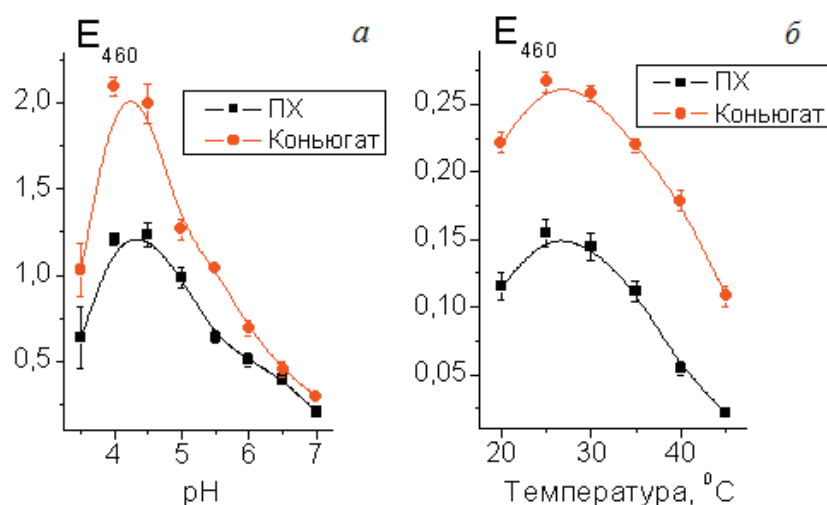


Рис. 7. Сравнение зависимости ферментативной активности конъюгата ДНК-ПХ и свободной ПХ от pH (а) и температуры (б)

**Изучение свойств ПХ в составе конъюгата с ДНК.** Было установлено, что конъюгация ПХ и ДНК приводит к изменению каталитических свойств фермента. Так, величина  $K_M$  конъюгата, определенная в координатах Лайнуивера-Бэрка в интервале концентраций *o*-дианизидина 8.2–65.5 мкМ, составила  $29.5 \pm 5.5$  мкМ. Данный показатель достоверно отличался от  $K_M$  свободного фермента ( $66.1 \pm 9.1$  мкМ). Уменьшение величины  $K_M$  свидетельствуют об увеличении сродства фермента к субстрату, предположительно за счет влияния полинуклеотидного микроокружения. Полученные результаты согласуются с имеющимися в литературе данными о повышенном сродстве *o*-дианизидина к ДНК [6].

Зависимость активности фермента от pH среды оказалась одинаковой для нативной ПХ и конъюгата и имела четко выраженный максимум в области pH между 4.0 и 4.5 (рис. 7, а). Полученное значение оптимума pH-зависимости ПХ в реакции с *o*-дианизидином отличалось от приведенного в работе [16], в которой максимум каталитической активности находился при pH = 5.0. Данный факт может быть объяснен наличием у ПХ большого количества изоферментов, отличающихся по своим каталитическим свойствам [18, с. 10–17]. Изучение температурной зависимости пероксидазной активности свободного фермента и конъюгата показало некоторое повышение термостабильности иммобилизованной ПХ при температуре выше 35°C. Так, уменьшение ферментативной активности при 40 и 45°C составило соответственно 65 и 86% от ее максимального значения в случае свободной ПХ и 33 и 60% в случае конъюгата ДНК-ПХ (рис. 7, б).

Также было изучено влияние некоторых ингибиторов (азид-ион, гидроксилламин) и активаторов ПХ (пиридин, аммиак) на ферментативную активность конъюгата (рис. 8). Чувствительность фермента в составе конъюгата к действию ингибиторов была меньше, чем свободной ПХ. Более значительные изме-



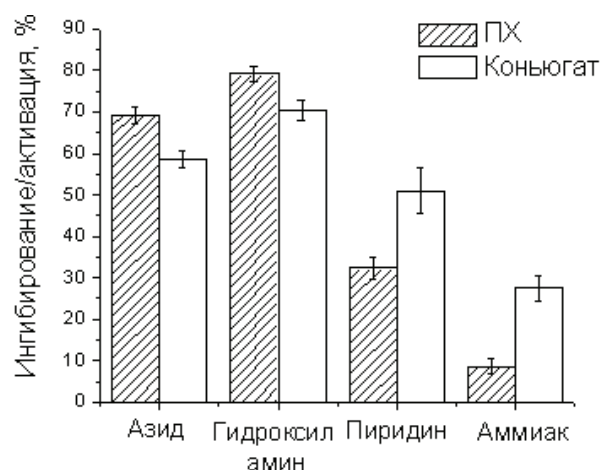


Рис. 8. Специфическое ингибирование и активация ПХ в составе конъюгата и свободного фермента. Концентрации эффекторов 0.006 М

нения наблюдались в случае активации фермента. Так, действие пиридина и аммиака приводило к более эффективной активации конъюгата, по сравнению с нативным ферментом (в 1.6 раза для пиридина и 3.3 раза для аммиака). Вероятно, это объясняется сродством данных эффекторов к молекуле ДНК.

**Иммобилизация конъюгата на поверхности электрода.** Процесс иммобилизации контролировали электрохимически по скорости пероксидазного окисления гидрохинона в присутствии пероксида водорода. Сигналом служил ток восстановления образующегося бензохинона, регистрируемый при потенциале  $-200$  мВ отн. Ag/AgCl. В области малых концентраций гидрохинона величина тока принималась пропорциональной активности фермента (содержанию конъюгата на поверхности электрода). Измерение сигнала проводили для насыщающих концентраций субстратов.

В существующей литературе широко представлены способы иммобилизации нуклеиновых кислот на углеродных материалах [1], включая стеклоуглеродные электроды [19]. Эти способы, как правило, включают электрохимическую подготовку электродов и сорбцию ДНК при приложенном положительном потенциале в результате электростатического притяжения отрицательно заряженных молекул ДНК и положительно заряженной поверхности электрода.

Изучение удерживания ДНК-пероксидазного конъюгата на поверхности немодифицированных стеклоуглеродных электродов отражено на рис. 9, а. Наложение потенциала  $+500$  мВ приводило к эффективному удерживанию ДНК на электроде при отмывании сенсора в перемешиваемом растворе. Отклик сенсора для аналогичной нагрузки конъюгата в отсутствие наложенного потенциала оказался значительно ниже из-за десорбции конъюгата с поверхности преобразователя при отмывке. Однако иммобилизация конъюгата с помощью наложения потенциала не гарантирует стабильности биослоя, так как наблюдается десорбция гидрофильного конъюгата с гидрофобной поверхности электрода при инкубации сенсора с различными буферными растворами и при измерении его сигнала.

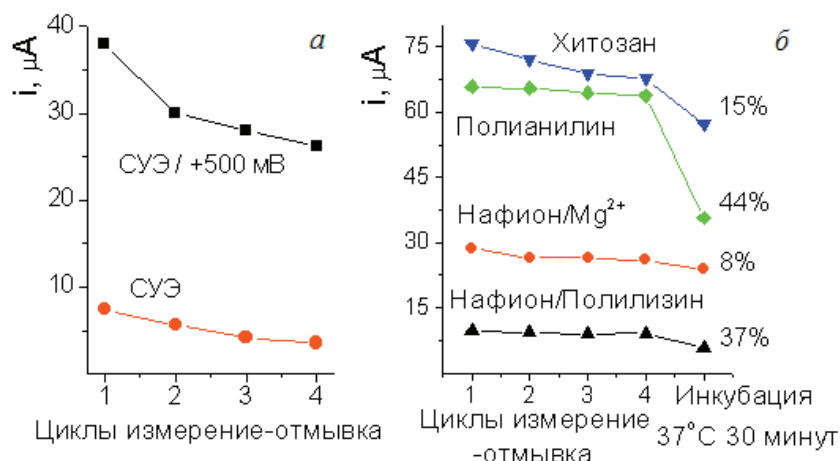


Рис. 9. Иммунизация конъюгата ДНК-ПХ на поверхности немодифицированных (а) и модифицированных (б) стеклоглеродных электродов

В связи с этим были исследованы другие способы иммобилизации конъюгата с использованием различных полимеров. В качестве таких модификаторов электродов, широко используемых для иммобилизации биологического компонента, были изучены хитозан, нафийон и полианилин. Хитозан является природным полиаминосахаридом, теряющим свою растворимость при  $\text{pH} > 6.5$ . Этот полимер способен образовывать прочную пленку на поверхности электрода при высушивании его раствора при повышенной температуре [20]. Нафийон представляет собой ионообменный полимер, несущий отрицательный заряд, растворимый в органических растворителях и малорастворимый в воде [21]. Иммобилизацию конъюгата ДНК-ПХ на поверхности электродов, покрытых нафийоном, осуществляли через промежуточный слой полилизина или ионов магния, имеющих положительный заряд. Этот способ, основанный на последовательном нанесении на электрод разноименных по заряду слоев, взаимодействующих между собой в результате электростатического притяжения, применяется для иммобилизации ДНК на поверхности электрохимических сенсоров [12]. Эксперименты с использованием электродов, модифицированных хитозаном и нафийоном/полилизин (нафийоном/ $\text{Mg}^{2+}$ ), проводили в трис-НСI буфере,  $\text{pH} 7.4$ .

В качестве слоя-предшественника для иммобилизации конъюгата также использовали полианилин, получаемый в процессе электрополимеризации анилина на поверхности электродов. При этом структура и толщина электрополимеризованной пленки зависела от скорости разверстки потенциала ( $V$ ) и количества циклов ( $N$ ) [22]. Модификацию электродов в работе осуществляли при  $V = 100$  мВ/с и  $N = 5$ . Так как этот полимер проявляет электропроводящие свойства только в слабокислой среде, измерения с использованием полианилина проводили в ацетатном буферном растворе,  $\text{pH} 5.0$ .

Предварительно было изучено влияние модификации электродов на изменение электрохимического сигнала присутствия некоторых деполаризаторов:

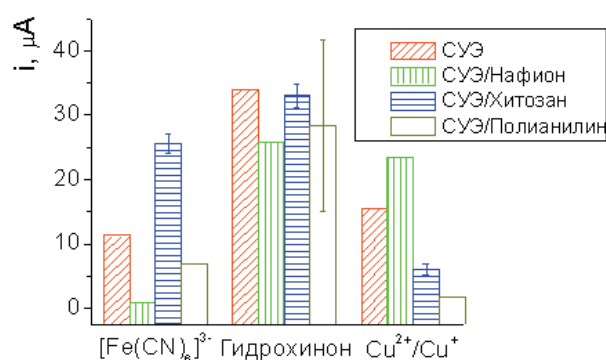


Рис. 10. Влияние модификации электродов на электрохимический сигнал некоторых депольризаторов

ферроцианид-иона, иона меди (II) и гидрохинона (рис. 10). Результаты показали, что модификация электродов полимерами не приводила к значительному изменению тока окисления гидрохинона. Однако, в случае использования полианилина наблюдалось значительное увеличение сигнала с течением времени за счет куммулятивного эффекта. Электростатическое взаимодействие положительно заряженного хитозана и отрицательно заряженного нафiona с ферроцианид-анионом и катионом меди (II) приводило к закономерному изменению тока восстановления этих ионов (уменьшению в случае одноименных и увеличению в случае разноименных зарядов полимера и депольризатора).

Сравнительное изучение зависимости аналитического сигнала в серии последовательных отмывок биосенсора для одинаковой нагрузки конъюгата, иммобилизованного на поверхности модифицированных электродов, представлено на рис. 9, *b*. Максимальные отклики были получены в случае применения хитозана и полианилина. Эти результаты свидетельствуют о высокой сорбционной емкости и стабильности хитозановой пленки на поверхности электрода. Необходимо отметить, что при использовании матрицы полианилина измерения проводились при pH 5.0, при котором пероксидазная активность конъюгата значительно выше (рис. 7, *a*). Этот полимер стабильно сорбировал конъюгат, предположительно, благодаря своему положительному заряду.

Сигнал, полученный для матриц нафион/ $\text{Mg}^{2+}$  и нафион/полилизин оказался ниже. Однако иммобилизация конъюгата на поверхности этих матриц является более специфичной благодаря высокому сродству ионов магния и полилизина к молекуле ДНК [23]. Значительное уменьшение сигнала сенсора в случае использования полилизина может быть обусловлено ингибированием активности фермента в результате взаимодействия данного полипептида с ДНК в составе конъюгата. В целом, сорбция конъюгата на электродах, модифицированных пленкой нафион/ $\text{Mg}^{2+}$ , оказалась более эффективной и стабильной по сравнению с пленкой нафион/полилизин.

Было установлено, что удерживание конъюгата на поверхности модифицированных электродов чувствительно к повышению температуры. Так, во всех четырех способах иммобилизации происходило уменьшение сигнала сенсора за счет десорбции биокомпонента после 30-минутной инкубации в рабочем буфере

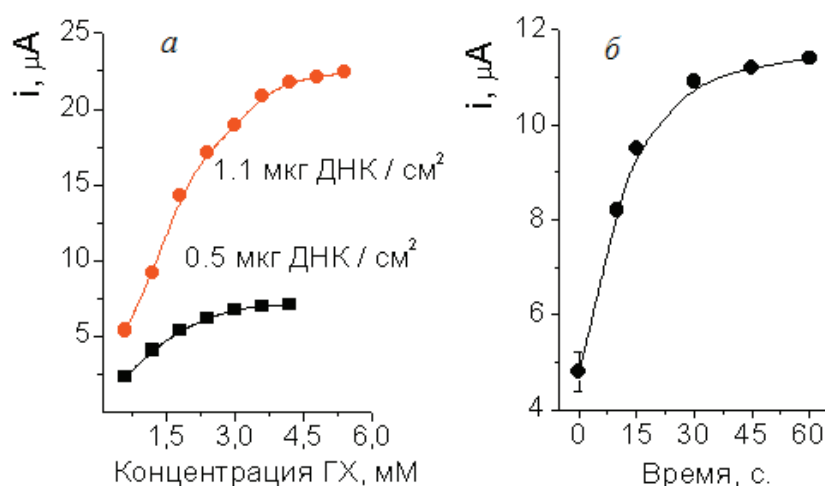


Рис. 11. Изучение зависимости отклика биосенсора от концентрации гидрохинона и нагрузки конъюгата (а) и времени перемешивания (б)

при температуре 37–40°C (рис. 9, б). В то же время, 30-минутная инкубация при комнатной температуре не приводила к уменьшению отклика биосенсоров. Максимальная десорбция конъюгата наблюдалась в случае модификации электрода полианилином, минимальная – для матрицы нафион/ $\text{Mg}^{2+}$ . Уменьшение сигнала составило 44 и 8% процентов, соответственно. Послойное нанесение нафиона и ионов магния использовалось в дальнейших экспериментах для иммобилизации конъюгата.

Изучение рабочих характеристик биосенсора показало обычную картину зависимости сигнала ферментного электрода от концентрации субстрата. Насыщающая концентрация гидрохинона в избытке пероксида водорода составила для разных нагрузок конъюгата около 3.0 и 4.2 мМ (соответственно при нанесении 1 и 2 мкл раствора конъюгата, концентрация ДНК 4.4 мкг/мл) (рис. 11, а). Первоначальный сигнал сенсора не зависел от времени перемешивания в интервале от 30 с до 3 мин. После прекращения перемешивания наблюдалось быстрое увеличение сигнала за счет накопления продукта ферментативной реакции с выходом на плато после 30–45 с реакции (рис. 11, б). Полученные результаты свидетельствуют о высокой каталитической активности ДНК-пероксидазного конъюгата и скорости переноса регистрируемого продукта ферментативной реакции к поверхности электрода. В этом случае скорость реакции и сигнал биосенсора контролируются массопереносом субстратов к активному центру фермента.

### Summary

*T.I. Abdullin, V.G. Vinter, M.V. Kolandinskaya, G.A. Evtugyn, G.K. Budnikov.* DNA-peroxidase conjugate. Synthesis, properties and immobilization on glassy carbon electrodes.

In this research we have developed the method for conjugation of double stranded or denaturated DNA and peroxidase from horse radish (HRP) by cross-linking with glutaraldehyde. The conditions of the conjugation efficiency and stability of the conjugate were elaborated. The HPR activity of the conjugate and its changes in the presence of specific inhibitors

and activators were estimated. The results obtained show that immobilization of HRP on DNA molecule changes its catalytic properties in comparison with that of native enzyme. Different techniques of conjugate sorption on bare and modified glassy carbon electrodes were investigated using electrochemical detection of HRP activity. Working parameters of the biosensor, i.e. the dependence of the signal on the time, conjugate loading and substrate concentration were specified to establish reproducible and stable response.

### Литература

1. *Lucarelli F., Marrazza G., Turner A.P.F., Mascini M.* Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2004. – V. 19. – P. 515–530.
2. *Nakayama M., Ihara T., Nakano K., Maeda M.* DNA sensors using a ferrocene-oligonucleotide conjugate // *Talanta.* – 2002. – V. 56. – P. 857–866.
3. *Wang J.* Nanoparticle-based electrochemical DNA detection // *Analytica Chimica Acta.* – 2003. – V. 500. – P. 247–257.
4. *Pividori M.I., Merkoçi A., Alegret S.* Classical dot-blot format implemented as an amperometric hybridisation genosensor // *Biosensors & Bioelectronics.* – 2001. – V. 16. – P. 1133–1142.
5. *Rauf S., Gooding J.J., Akhtar K., Ghauri M.A., Rahman M., Anwar M.A., Khalid A.M.* Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction // *J. of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2005. – V. 37. – P. 205–217.
6. *Jasnowska J., Ligaj M., Stupnicka B., Filipiak M.* DNA sensor for o-dianisidine // *Bioelectrochemistry.* – 2004. – V. 64. – P. 85–90.
7. *Ban C., Chung S., Park D.-S., Shim Y.-B.* Detection of protein-DNA interaction with a DNA probe: distinction between single-strand and double-strand DNA-protein interaction // *Nucleic Acids Research.* – 2004. – V. 32, No 13. – e110.
8. *Babkina S.S., Medyantseva E.P., Budnikov H.C., Tyshlek M.P.* New variants of enzyme immunoassay of antibodies to DNA // *Analytical Chemistry.* – 1996. – V. 68. – P. 3827–3831.
9. *Boireau W., Zeeh J.C., Puig P.E., Pompon D.* Unique supramolecular assembly of a redox protein with nucleic acids onto hybrid bilayer: towards a dynamic DNA chip // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2005. – V. 20. – P. 1631–1637.
10. *Rusling J.F.* Sensors for toxicity of chemicals and oxidative stress based on electrochemical catalytic DNA oxidation // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2004. – V. 20. – P. 1022–1028.
11. *Chen X., Ruan C., Kong J., Deng J.* Characterization of the direct electron transfer and bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase in DNA film at pyrolytic graphite electrode // *Analytica Chimica Acta.* – 2000. – V. 412. – P. 89–98.
12. *Gu T., Hasebe Y.* Peroxidase and methylene blue-incorporated double stranded DNA-polyamine complex membrane for electrochemical sensing of hydrogen peroxide // *Analytica Chimica Acta.* – 2004. – V. 525. – P. 191–198.
13. *Ding X., Li J., Hu J., Li Q.* Electrochemical study of the interaction between cytochrome c and DNA at a modified gold electrode // *Analytical Biochemistry.* – 2005. – V. 339. – P. 46–53.
14. *Шишкина И.Г., Левина А.С., Зарытова В.Ф.* Аффинные сорбенты, содержащие нуклеиновые кислоты и их фрагменты // *Успехи Химии.* – 2001. – Т. 70, № 6. – С. 581–608.

15. *Timofeev E.N., Kochetkova S.V., Mirzabekov A.D., Florentiev V.L.* Regioselective immobilization of short oligonucleotides to acrylic copolymer gels // *Nucleic Acids Research*. – 1996. – V. 24, No 16. – P. 3142–3148.
16. *Савенкова М.И., Курченко В.П., Метелица Д.И.* Оптимальный режим окисления о-дианизидина пероксидазой хрена // *Биохимия*. – 1984. – Т. 49, No 5. – С. 850–856.
17. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
18. *Андреева В.А.* Фермент пероксидаза. – М.: Наука, 1988. – 129 с.
19. *Pedano M.L., Rivas G.A.* Immobilization of DNA on glassy carbon electrodes for the development of affinity biosensors // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2003. – V. 18. – P. 269–277.
20. *Krajewska B.* Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review // *Enzyme and Microbial Technology*. – 2004. – V. 35. – P. 126–139.
21. *Pontié M., Cowache P., Klein L.H., Maurice V., Bedioui F.* Preparation and characterization of an electronically conductive and chemically modified ultrafiltration type membrane // *J. of Membrane Science*. – 2001. – V. 184. – P. 165–173.
22. *Pile D.L., Hillier A.C.* Electrochemically modulated transport through a conducting polymer membrane // *J. of Membrane Science*. – 2002. – V. 208. – P. 119–131.
23. *Segura T., Volk M.J., Shea L.D.* Substrate-mediated DNA delivery: role of the cationic polymer structure and extent of modification // *J. of Controlled Release*. – 2003. – V. 93. – P. 69–84.

Поступила в редакцию  
24.05.05

---

**Абдуллин Тимур Илдарович** – аспирант кафедры биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: *Tabdulli@ksu.ru*

**Винтер Виктор Георгиевич** – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии Казанского государственного университета.

**Коландинская Марина Владимировна** – студентка 5-го курса кафедры биохимии Казанского государственного университета.

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

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

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