

УДК 544.653.2:577.323.7

ОЦЕНКА СТРУКТУРНОГО СОСТОЯНИЯ ДНК С ПОМОЩЬЮ ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ БИОСЕНСОРОВ

*О.В. Бондарь, И.И. Никитина, Р.Р. Хазиахметова,
А.А. Ризванов, Т.И. Абдуллин*

Аннотация

Предложен способ оценки структурного состояния ДНК, основанный на электрохимическом окислении гуаниновых нуклеотидов на электроде, модифицированном углеродными нанотрубками. Денатурация ДНК приводит к увеличению тока ее окисления на модифицированном электроде, что позволяет оценивать степень нативности ДНК и влияние на ее структуру денатурирующих факторов. Показана возможность использования модифицированных электродов для детектирования продуктов депуринизации и окислительного повреждения оснований ДНК.

Введение

Носители наследственной информации – дезоксирибонуклеиновые кислоты – являются одним из главных объектов исследований в биомедицине. Как и большинство биополимеров, ДНК относительно нестабильны и подвержены повреждению под действием различных факторов [1]. Это обуславливает необходимость оценки качества препаратов ДНК, используемых в биологических исследованиях. Для решения этой задачи обычно применяют электрофоретические или оптические методы, которые трудоемки и часто не достаточно информативны [2, 3]. Перспективной альтернативой им являются электрохимические методы, широко используемые в настоящее время для экспресс-анализа биологически активных веществ и создания селективных биосенсоров [4].

Электрохимическое определение ДНК основано на способности азотистых оснований и нуклеотидов окисляться на электроде, что позволяет детектировать ДНК напрямую, без использования меток или красителей [5]. Известно, что электрохимический сигнал ДНК зависит от ее структуры, благодаря чему можно выявлять повреждение биополимера под действием химических агентов [4]. Однако на обычных электродах ДНК обладает низкой электрохимической активностью [6], что приводит к недостаточной чувствительности ее определения и, как следствие, сдерживает развитие электрохимических методов анализа ДНК. Исследования последних лет, в том числе проведенные нами, показывают, что углеродные нанотрубки (УНТ) катализируют медленные электрохимические реакции с участием биомолекул, в том числе нуклеиновых кислот и их компонентов [7–9]. Поэтому использование электродов на основе УНТ является перспективным способом увеличения чувствительности детектирования ДНК. В настоящем исследовании с помощью электродов, модифицированных

УНТ, предложен новый способ оценки нативности ДНК и выявления процессов, приводящих к ее повреждению.

1. Экспериментальная часть

В работе использовали многостенные углеродные нанотрубки (Sigma-Aldrich, Германия), ДНК из эритроцитов цыплят (Reanal, Венгрия), гуанин, 2-дезоксигуанозин-3'-монофосфат, агарозу, ЭДТА (Serva, Германия), формалин (Экрос, Россия), бромид этидия (Koch-Light, Англия).

ДНК денатурировали термически без формалина и в присутствии формалина. Для этого в раствор ДНК в SSC-буфере добавляли нейтрализованный формалин, содержащий 0.001 М ЭДТА, до конечной концентрации 1%, далее растворы инкубировали в кипящей бане 15 мин и быстро охлаждали на льду. Электрофорез нуклеиновых кислот проводили в горизонтальной камере в 0.7%-ном агарозном геле [2].

Электрохимические измерения проводили с помощью вольтамперометрического анализатора «Экотест ВА» (Эконикс-Эксперт, Россия) в режиме линейного сканирования потенциала. Стеклоуглеродные электроды (СУЭ) модифицировали путем формирования на рабочей поверхности слоя углеродных нанотрубок, предварительно окисленных в смеси серной и азотной кислот [7, 8]. Электрохимическая ячейка состояла из рабочего дискового СУЭ, модифицированного УНТ (СУЭ-УНТ), никелевого противоэлектрода и хлоридсеребряного электрода сравнения. В качестве фонового электролита использовали 0.01 М CH_3COONa + 0.1 М NaCl (pH 5.0) или 0.01 М NaH_2PO_4 + 0.1 М NaCl (pH 7.0). Биомолекулы предварительно адсорбировали на СУЭ-УНТ, выдерживая электрод в растворе ДНК (1 мг/мл) или дезоксигуанозинмонофосфата (дГМФ, 3 мМ) установленное время, и далее записывали анодные вольтамперограммы в отсутствие биомолекул в электролите.

2. Результаты и их обсуждение

На чистом стеклоуглеродном электроде ДНК не проявляет заметной электрохимической активности, но после модификации СУЭ углеродными нанотрубками на анодной вольтамперограмме наблюдается выраженный пик при потенциале около +1.1 В (рис. 1, пик 2). Ранее показано, что этот пик соответствует окислению дГМФ – наиболее легко детектируемого нуклеотида ДНК [8]. Интенсификация окисления ДНК на модифицированном электроде, очевидно, обусловлена способностью УНТ формировать на поверхности СУЭ однородные наноструктурированные слои, которые эффективно адсорбируют ДНК и облегчают ее электроокисление [7, 8]. Результаты предполагают возможность применения СУЭ-УНТ для чувствительного детектирования ДНК и создания ДНК-сенсоров с использованием тока окисления дГМФ в качестве сигнала.

Изучена зависимость величины тока окисления ДНК на СУЭ-УНТ от вторичной структуры биополимера. Для этого сравнивали сигналы, генерируемые нативной ДНК и ДНК после термической денатурации в присутствии формалина и без него. Степень нативности ДНК контролировали электрофоретически. Установлено, что денатурированная ДНК генерирует больший сигнал на СУЭ-

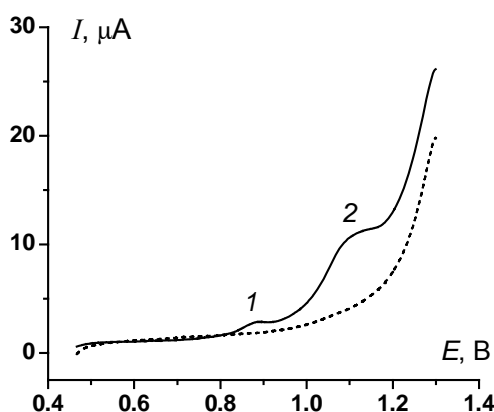


Рис. 1. Анодная вольтамперограмма денатурированной ДНК, адсорбированной на СУЭ-УНТ. Ацетатный буферный раствор, pH 5.0, скорость сканирования 0.1 В/с

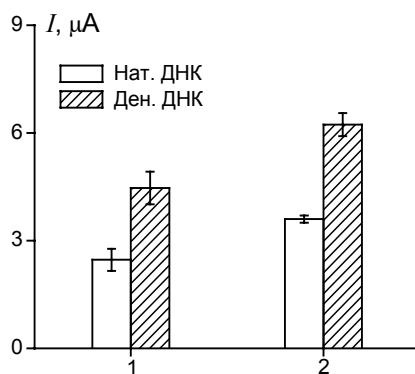


Рис. 2. Изменение величины тока окисления ДНК на СУЭ-УНТ при денатурации биополимера: 1 — без формалина; 2 — с формалином

УНТ, чем нативная ДНК (рис. 2). По-видимому, это обусловлено лучшей адсорбцией на СУЭ-УНТ денатурированного биополимера, содержащего доступные для связывания с УНТ азотистые основания.

Формалин оказывает дополнительный денатурирующий эффект, поэтому в присутствии формалина как нативная, так и денатурированная ДНК генерируют на СУЭ-УНТ больший сигнал, чем без формалина (рис. 2). Электрофоретическое исследование не выявило структурных изменений в ДНК под влиянием формалина. Это показывает, что СУЭ-УНТ позволяет обнаруживать достаточно тонкие изменения в структуре ДНК под действием денатурирующих агентов.

После термической денатурации на вольтамперограмме ДНК появляется новый пик, предшествующий пику ДНК (рис. 1, пик 1). Ранее показано, что пик 1 соответствует окислению свободного гуанина, детектируемого при более низком потенциале, чем соответствующий нуклеотид [8, 10]. Это означает, что термическая обработка ДНК сопровождается ее депуринизацией — отрывом пуриновых оснований. Пик окисления гуанина, адсорбированного на СУЭ-УНТ, линейно возрастает с увеличением концентрации основания, что позволяет определять содержание примеси гуанина в препаратах ДНК и обнаруживать гуанин,

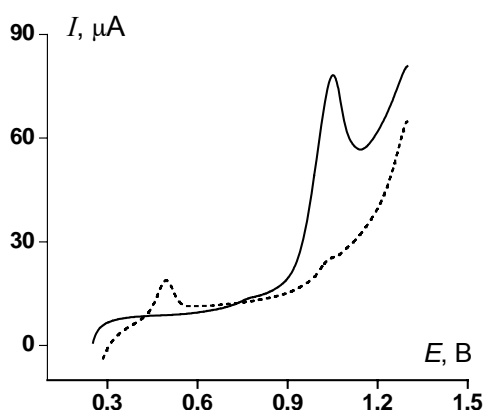


Рис. 3. Анодные вольтамперограммы дГМФ (сплошная линия) и его 8-оксопроизводного (штриховая линия), адсорбированных на СУЭ-УНТ. Фосфатный буферный раствор, pH 7.0, скорость сканирования 1 В/с

образующийся при депуринизации ДНК [10]. Известно, что депуринизация *in vivo* приводит к потере генетической информации и мутациям [11], кроме того, этот процесс ухудшает качество препаратов ДНК. Это обуславливает актуальность использования СУЭ-УНТ в биомедицинских исследованиях для обнаружения депуринизации нуклеиновых кислот.

Наряду с депуринизацией ДНК и нарушением ее вторичной структуры важнейшим типом повреждений ДНК является ее окисление активными формами кислорода [1]. Известно, что одними из наиболее распространенных продуктов окисления ДНК *in vivo* являются 8-оксопроизводные гуанина [1, 12]. Электрохимическое окисление гуанина и его производных тоже приводит к образованию этих соединений [13], что свидетельствует о сходстве электрохимических реакций с окислительными процессами *in vivo*. В качестве модели окисления ДНК нами изучено анодное поведение дГМФ на СУЭ-УНТ. Установлено, что электрохимическое окисление этого нуклеотида сопровождается образованием нового продукта, обнаруживаемого при повторном сканировании потенциала при более низком потенциале, чем дГМФ и гуанин (рис. 3). Учитывая данные литературы [13], можно сделать вывод о том, что наблюдаемый продукт соответствует 8-оксопроизводному гуанина. Это демонстрирует возможность обнаружения окислительного повреждения ДНК под действием токсических агентов с помощью разработанных СУЭ-УНТ.

Summary

O.V. Bondar, I.I. Nikitina, R.R. Khazyakhmetova, A.A. Rizvanov, T.I. Abdullin. Evaluation of DNA structure integrity using electrochemical biosensors.

We offer a method for evaluation of DNA integrity based on the electrochemical oxidation of guanine nucleotides at carbon nanotubes modified electrodes. Melting of DNA causes the increase in its oxidation current at the modified electrode that allows estimation of DNA denaturation extent and the effect of denaturing factors on DNA double stranded structure. Modified electrodes have been also employed for the detection of products of DNA depurination and oxidative damage of DNA bases.

Литература

1. *Kawanishi S., Hiraku Y., Oikawa S.* Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging // *Mutat. Res.* – 2001. – V. 488. – P. 65–76.
2. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 479с.
3. *Murakami A., Nakaura M., Nakatsuji Y., Nagahara S., Tran-Cong Q., Makino K.* Fluorescent-labeled oligonucleotide probes: detection of hybrid formation in solution by fluorescence polarization spectroscopy // *Nucleic Acids Res.* – V. 19, No 15. – P. 4097–4102.
4. *Wang J.* Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics // *Biosens. Bioelectron.* – 2006. – V. 21. – P. 1887–1892.
5. *Pividori M.I., Mercoci A., Alegret S.* Electrochemical genosensor design: immobilization of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods // *Biosens. Bioelectron.* – 2000. – V. 15. – P. 291–303.
6. *He P., Xu Y., Fang Y.* Applications of carbon nanotubes in electrochemical DNA biosensors // *Microchim. Acta.* – 2005. – V. 152. – P. 175–186.
7. *Абдуллин Т.И., Никитина И.И., Бондарь О.В., Ишмухаметова Д.Г., Коновалова О.А., Салахов М.Х.* Конструирование и тестирование электродов на основе многостенных углеродных нанотрубок // *Рос. нанотехнологии.* – 2007. – Т. 2, № 7–8. – С. 156–160.
8. *Абдуллин Т.И., Никитина И.И., Ишмухаметова Д.Г., Будников Г.К., Коновалова О.А., Салахов М.Х.* Электроды, модифицированные углеродными нанотрубками, для электрохимических ДНК-сенсоров // *Журн. аналит. химии.* – 2007. – Т. 62, № 6. – С. 667–671.
9. *Merkoci A.* New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes // *Trends Anal. Chem.* – 2005. – V. 24, No 9. – P. 826–838.
10. *Никитина И.И., Бондарь О.В., Хазиахметова Р.Р., Абдуллин Т.И.* Детектирование депуринизации нуклеиновых кислот на электроде, модифицированном углеродными нанотрубками // VII науч. конф. молодых ученых, аспирантов и студентов НОЦ Казан. гос. ун-та «Материалы и технологии XXI века»: Тез. докл. – Казань, 2007. – С. 90.
11. *Sheppard T.L., Ordoukhanian P., Joyce G.F.* A DNA enzyme with N-glycosylase activity // *PNAS.* – 2000. – V. 97, No 14. – P. 7802–7807.
12. *Pilger A., Ivancsits S., Germadnik D. et al.* Urinary excretion of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measured by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection // *J. Chromatogr.* – 2002. – V. 778. – P. 393–401.
13. *Subramanian P., Dryhurst G.* Electrochemical oxidation of guanosine. Formation of some novel guanine oligonucleosides // *J. Electroanal. Chem.* – 1987. – V. 224. – P. 137–162.

Поступила в редакцию
26.09.07

Бондарь Оксана Викторовна – студент биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета.

E-mail: o.v.bondar@mail.ru

Никитина Ирина Игоревна – студент биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета.

E-mail: nikitinairi@mail.ru

Хазиахметова Регина Раисовна – студент биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета.

Ризванов Альберт Анатольевич – Ph.D., доцент кафедры генетики Казанского государственного университета, старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории Казанского государственного медицинского университета.

Абдуллин Тимур Илдарович – ассистент кафедры биохимии Казанского государственного университета.