

УДК 543.257.5

**КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЕ Cu(II) – ДНК:
ВЫБОР ФОРМЫ БИОЛИГАНДА И УСЛОВИЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
Cu(II) С ПОМОЩЬЮ БИОСЕНСОРА**

С.С. Бабкина, Е.Н. Моисеева, Ю.И. Сальников

Аннотация

Изучено комплексообразование ионов тяжелых металлов на примере ионов Cu(II) с различными формами дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). Определены константы устойчивости и установлен состав комплексов Cu(II) с различными формами ДНК с помощью спектрофотометрических данных. Предложена методика выбора оптимальной формы биолиганда для иммобилизации в составе амперометрического биосенсора (БС). На основании полученных данных разработан ДНК-содержащий амперометрический БС для селективного определения Cu(II) в природных и биологических объектах (сыворотке крови человека). Предложенная методика отличается высокой чувствительностью, хорошей воспроизводимостью, экспрессностью и простотой пробоподготовки.

Введение

Изучение комплексообразования тяжелых металлов с молекулами ДНК, выяснение природы этого взаимодействия позволили установить их высокое сродство к данным биолигандам [1, 2]. Ион Cu(II) обладает наибольшим сродством к азотистым основаниям ДНК, и механизм их взаимодействия в некоторой мере может послужить моделью системы ДНК-металл, изучение которой позволит предсказать и количественно оценить действие тяжелых металлов на структуру и функции ДНК [3, 4]. Значение исследований действия тяжелых металлов на ДНК особенно возрастает в последние годы в связи с увеличением загрязнения ими окружающей среды. Ионы тяжелых металлов, встраиваясь в молекулу ДНК, вызывают мутагенные и канцерогенные эффекты [5]. Обнаружено, что в опухолевой ткани содержится большее количество тяжелых металлов (Cu (II), Cd(II), Zn(II)), чем в нормальной [6, 7].

В связи с этим актуально использование биосенсоров (БС) на основе ДНК для определения тяжелых металлов на примере ионов Cu(II) для уточнения предельно-допустимых норм содержания данного металла в различных объектах эколого-аналитического контроля. Электрохимические БС на основе ДНК объединяют чувствительность метода детекции с высокой специфичностью биомолекул, уменьшают количество расходуемой ДНК и позволяют разрабатывать современные методы анализа эффекторов ДНК [8–12]. Высокое сродство ионов Cu(II) к ДНК было использовано для выбора формы биолиганда и оптимальных условий проведения анализа, а также для разработки методики определения Cu(II) в природной воде и сыворотке крови человека.

1. Постановка задачи

Цель данной работы – изучение комплексообразования ионов тяжелых металлов на примере ионов Cu(II) с различными формами ДНК для выбора оптимальной для иммобилизации формы биолиганда и разработка методики анализа экологических и биологических объектов на содержание ионов Cu(II) с помощью предложенного амперометрического ДНК-содержащего БС.

2. Методика

2.1. Материалы и методы. Вольтамперометрические определения проводились с помощью вольтамперометрической системы SVA-1BM-01 «Аналитик» (Болгария). Рабочим электродом служил стационарный ртутно-пленочный электрод (СРПЭ) с серебряной подложкой ($d = 0.5$ мм) либо разработанный БС, в котором мембрана с иммобилизованной денатурированной ДНК (д-ИДНК) закрепляется на поверхности СРПЭ с серебряной подложкой [13]. Электрод сравнения – насыщенный каломельный электрод (нас. к. э.). Растворенный кислород удаляли из исследуемых растворов током аргона в течение 15 мин., во время регистрации вольтамперограмм газ пропускали над раствором.

Электронные спектры поглощения были сняты на спектрофотометре U-2000 “Hitachi” (Япония) в кюветах толщиной 1 см. Точность измерения оптической плотности составляла $\pm 1\%$. Все измерения проводили при термостатировании 298 ± 2 К.

Использовали ДНК эритроцитов цыплят фирмы “Reanal”: соотношение N/P 1.6–1.7. Растворы ДНК с концентрацией 0.01 мг/мл в физиологическом растворе (0.9%-ный раствор NaCl) готовили по точной навеске. Концентрацию растворов ДНК определяли спектрофотометрически по поглощению при $\lambda = 258$ нм.

Применялись следующие химические реагенты и растворы: нитрат целлюлозы (НЦ) ФТ-30 типа коллоксилин марки ч. со средним содержанием азота 11.5–12%; органические растворители высокой чистоты марки х.ч. (ацетон, толуол, гексан) и 25%-ный раствор глутарового альдегида фирмы “Reanal”; фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) pH = 7.3; раствор комплексона III с концентрацией 0.1 моль/л, приготовленный из стандартного фиксаля.

Исходный раствор соли Cu(II) с концентрацией $1.0 \cdot 10^{-3}$ моль \cdot л $^{-1}$ готовили растворением нитрата Cu(II) в тридистиллированной воде. Точную концентрацию раствора устанавливали методом комплексонометрии. Исследуемые растворы готовили по точной навеске и методом последовательных разбавлений.

2.2. Приготовление биочувствительной части амперометрического ДНК-содержащего биосенсора. Образцы д-ИДНК получали путем растворения навески НЦ в системе органических растворителей при постоянном перемешивании на магнитной мешалке с последующим добавлением водного раствора денатурированной ДНК (д-ДНК) (денатурацию проводят кипячением раствора ДНК на водяной бане с последующим резким охлаждением) и раствора глутарового альдегида для химического связывания молекул д-ДНК с НЦ матрицей. После этого на поверхности чашки Петри формировали пленку и высушивали ее в течение 5 мин. Полученные образцы д-ИДНК хранили в хо-

лодильнике при $t = 2-5^{\circ}\text{C}$. Биочувствительную часть БС, полученную по данной методике, закрепляли на корпусе электрохимического детектора (СРПЭ) с помощью прижимных колец [13].

2.3. Обработка спектрофотометрических данных. Обработку результатов спектрофотометрических исследований комплексообразования Cu(II) – ДНК проводили на основании зависимости оптической плотности растворов от концентрации ионов металла-комплексообразователя (Cu(II)) при постоянной концентрации лиганда ДНК (L) с использованием программы SPRESSP [14, 15].

Расчет констант устойчивости комплексов $\beta = [\text{Cu}_n\text{L}_m]/([\text{Cu}^{2+}]^n \times [\text{L}]^m)$ проводили на основании выражения:

$$A = A_0 + \varepsilon_L[\text{L}] + \varepsilon_{\text{Cu}^{2+}}[\text{Cu}^{2+}] + \varepsilon_{\text{CuL}}[\text{CuL}] + \varepsilon_{\text{Cu}_2\text{L}}[\text{Cu}_2\text{L}] + \dots,$$

где A – оптическая плотность раствора, содержащего различные формы ионов Cu(II) и ДНК, а ε_L , $\varepsilon_{\text{Cu}^{2+}}$, ε_{CuL} , $\varepsilon_{\text{Cu}_2\text{L}}$ – коэффициенты экстинкции соответствующих форм.

Для установления состава комплекса Cu(II) с д-ИДНК и его константы устойчивости спектрофотометрическим методом определяли равновесную концентрацию ионов Cu(II) в процессе комплексообразования. Для этого готовили серию растворов $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (рН = 2.5) с различной начальной концентрацией ионов Cu(II) в диапазоне от $1 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л, на 15 мин. опускали в каждый из них НЦ мембрану с д-ИДНК. После проведения реакции комплексообразования при перемешивании брали аликвоту раствора нитрата Cu(II), добавляли раствор комплексона III ($C = 2.5 \cdot 10^{-2}$ моль/л) и измеряли D_{276} [16]. Концентрацию ионов Cu(II) определяли с помощью градуировочной зависимости D_{276} растворов, содержащих комплекс Cu(II) – ЭДТА, от концентрации ионов Cu(II).

2.4. Определение содержания ионов Cu(II) в модельных растворах с помощью амперометрического ДНК-содержащего биосенсора. Амперометрический БС, содержащий д-ИДНК, погружали в электрохимическую ячейку с раствором соли металла различной концентрации при рН 2.5 на 15 мин. Затем раствор сливали, ячейку промывали и заливали в нее 5 мл раствора ФСБ рН 7.3, содержащего комплексон III с концентрацией $2.5 \cdot 10^{-2}$ моль/л, деаэрировали раствор током аргона в течение 20 мин. и снимали вольтамперограммы в интервале потенциалов от -0.02 В до -1.5 В ($E_0 = -0.02$ В, скорость наложения потенциала равна 0.5 В/с). Измеряли высоту катодного пика при потенциале -0.4 В и по полученным данным строили градуировочный график зависимости тока восстановления комплексоната Cu(II) от концентрации ионов Cu(II).

3. Результаты и обсуждение

3.1. Выбор формы ДНК для иммобилизации в составе амперометрического БС; спектрофотометрическое изучение комплексообразования ионов Cu(II) с ДНК. Известно, что роль меди в организме неоднозначна. С одной стороны, она является необходимым элементом, так как связана с деятельно-

стью многих ферментов, витаминов, гормонов. Медь оказывает существенное влияние на различные виды обмена веществ, кроветворения, на рост и развитие организма, на его иммунологический статус при различных заболеваниях [17]. Медь имеет большое значение в образовании гемоглобина и эритроцитов, и недостаток этого микроэлемента вызывает тяжелые формы анемии [18]. При нарушении процесса синтеза гемоглобина в организме происходит накопление свободных ионов Cu(II) , которые могут оказывать токсический эффект на организм человека [2, 18, 19]. Это обуславливает необходимость контроля за их содержанием в сыворотке крови [20]. С другой стороны, как отмечалось выше, ионы Cu(II) имеют большое сродство к молекулам ДНК и, попадая в организм из окружающей среды, подобно другим тяжелым металлам вызывают одно- и двунитевые разрывы молекул ДНК, находятся в избыточном количестве в клетке раковых опухолей [5, 21–23]. Поэтому представляет интерес изучение комплексообразования ионов Cu(II) с ДНК с учетом влияния среды для уточнения и моделирования механизма этого процесса в организме, тем более что в литературе отсутствуют данные об истинном составе таких комплексов, особенно с иммобилизованной ДНК, хотя иммобилизация ДНК в составе БС повышает устойчивость ДНК к различным воздействиям, обеспечивает многократное использование дорогостоящего препарата и может позволить разработать методы определения тяжелых металлов в биологических и экологических объектах.

В спектрах поглощения д-ДНК (0.01 мг/мл) при pH 7.3 в физиологическом растворе наблюдается максимум полосы поглощения при $\lambda = 258$ нм. Спектр поглощения д-ДНК в УФ области связан с электронными переходами в хромофорных группах пуриновых и пиримидиновых оснований [19]. На спектрах поглощения раствора д-ДНК при pH 2.5 в присутствии ионов Cu(II) наблюдали увеличение D_{258} (гиперхромный эффект) и уширение полосы поглощения по сравнению со спектрами аналогичных растворов в отсутствие ионов Cu(II) , что свидетельствует о комплексообразовании данных ионов с молекулами ДНК, приводящем к нарушению структуры ДНК за счет разрыва водородных связей между азотистыми основаниями. Для установления состава образующихся комплексов и определения их констант устойчивости (β) было проведено определение оптической плотности растворов д-ДНК при pH = 2.5 с постоянной концентрацией в зависимости от концентрации ионов Cu(II) в диапазоне от $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л до $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Реакцию комплексообразования Cu(II) с д-ДНК проводили в кинетическом режиме при перемешивании раствора с постоянной скоростью в течение 15 мин. (выбрано как оптимальное). Обработка полученных данных выполнена с помощью программы SPSS [14, 15] (см. п. 2.3).

На основе электронных спектров поглощения рассчитаны доли накопления (α) комплексов различного состава и построены графики накопления всех значимых форм изучаемых комплексов. Результаты представлены на рис. 1 и в табл. 1. При расчете долей накопления комплексов в системе Cu(II) – д-ДНК обнаружено, что в данной системе существуют два типа комплексов (см. табл. 1), и по мере увеличения концентрации ионов Cu(II) происходит уменьшение доли комплекса $[\text{CuL}]$ (см. рис. 1, кривая 3) и увеличение доли комплекса $[\text{Cu}_2\text{L}]$ (см. рис. 1, кривая 2). При концентрации ионов Cu(II) $7.08 \cdot 10^{-5}$ моль/л доли комплексов $[\text{Cu}_2\text{L}]$ и $[\text{CuL}]$ составляют 0.8 и 0.68 соответственно.

Табл. 1
 Результаты изучения комплексообразования ионов Cu(II) с различными формами ДНК

Форма ДНК	д-ДНК, pH 2.5		д-ИДНК, pH 2.5
Состав комплекса	[CuL*]	[Cu ₂ L]	[Cu ₁₀ L ₄]
Соотношение нуклеотид : Cu(II)	1 : 1	1 : 2	1 : 2.5
lg β	10.1 ± 0.4	14.3 ± 0.1	61.03 ± 0.02
Доля комплекса при $c_{\text{Cu(II)}} = 2.19 \cdot 10^{-5}$ моль/л	0.8	0.62	0.92
Доля комплекса при $c_{\text{Cu(II)}} = 7.08 \cdot 10^{-5}$ моль/л	0.68	0.8	0.98

* L – один нуклеотид.

Для оценки параметров комплексообразования ионов Cu(II) с д-ИДНК спектрофотометрическим методом были определены равновесные концентрации ионов Cu(II) после проведения реакции комплексообразования (см. п. 2.3), и полученные результаты также были обработаны методом математического моделирования. Результаты представлены в табл. 1 и на рис. 1 (кривая 1).

Для подтверждения связывания ионов Cu(II) именно с молекулами д-ИДНК в составе НЦ мембраны в раствор с ионами Cu(II) опускали НЦ мембрану, не содержащую д-ИДНК. После перемешивания в течение 15 мин. все операции проводили, как описано в п. 2.3. D_{276} исследуемого раствора не уменьшилась и соответствовала D_{276} раствора с исходной концентрацией ионов Cu(II) до погружения в него НЦ мембраны, что доказывает отсутствие неспецифической сорбции ионов металла на матрице-носителе.

Из табл. 1 видно, что комплексообразование с д-ИДНК протекает более эффективно в сравнении с д-ДНК, поскольку для д-ИДНК соотношение нуклеотид – Cu(II) составляет 1 : 2.5 и полученное значение lg β в данном случае выше. В широкой области концентраций происходит полное связывание в комплекс д-ИДНК и при концентрации ионов Cu(II) $7.08 \cdot 10^{-5}$ моль/л доля комплекса Cu(II) – д-ИДНК максимальна по сравнению с д-ДНК и составляет 0.98.

Большое значение константы устойчивости, полученное для комплекса состава 10 : 4, соответствует равновесию процесса комплексообразования с участием большого числа частиц, поскольку значение β, как и всех констант равновесия, связано с изменением свободной энергии Гиббса реакции комплексообразования соотношением $\Delta G = -RT \ln \beta$.

Результаты, полученные с помощью данной методики, позволяют установить, что форма д-ИДНК является биолигандом с наибольшей комплексообразующей способностью и оптимальна для использования в составе БС. Это свя-

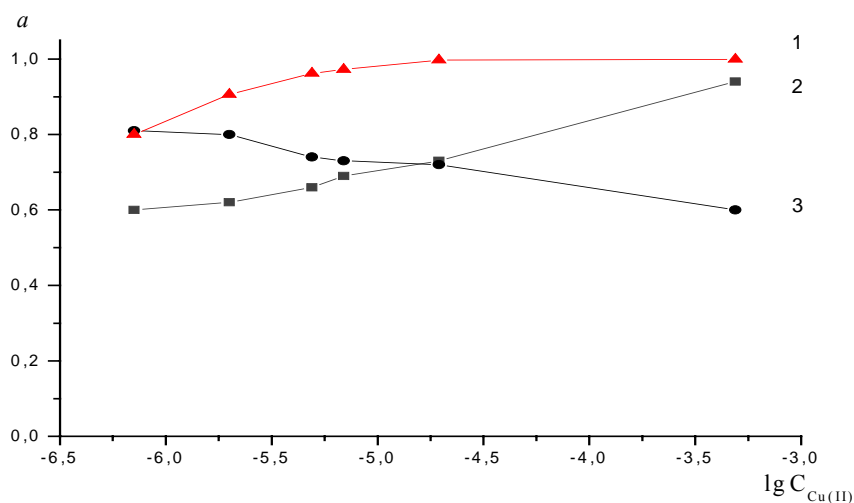


Рис. 1. Доли комплексов Cu(II) – ДНК в системах: 1 – Cu(II) – д-ИДНК, pH 2.5; 2 – Cu(II) – д-ДНК, pH 2.5; соотношение нуклеотид: Cu(II) = 1 : 2; 3 – Cu(II) – д-ДНК, pH 2.5; соотношение нуклеотид: Cu(II) = 1 : 1 с ДНК = 0.01 мг/мл

зано, по-видимому, с отсутствием межнитевых водородных связей, имеющих в форме нативной ДНК. Кроме того, так как химическое связывание молекул д-ДНК с НЦ матрицей происходит сразу после термической денатурации ДНК и ее резкого охлаждения, то образование водородных связей внутри одной цепи с образованием молекул глобулярной конфигурации (клубков) очень ограничено, в отличие от неиммобилизованной д-ДНК [1, 19]. В результате, в случае д-ИДНК мы имеем наиболее раскрученные и фиксированные на матрице молекулы д-ДНК с доступными центрами связывания.

3.2. Методика определения ионов Cu(II) с помощью амперометрического ДНК-содержащего БС. Полученные данные позволили нам использовать д-ИДНК в составе БС для определения тяжелых металлов в биологических и других объектах.

Биочувствительная часть разработанного нами БС на основе СРПЭ была получена путем иммобилизации термически денатурированной ДНК на НЦ мембране (см. п. 2.2). Предлагаемая методика определения ионов Cu(II) в объектах аналитического контроля с помощью амперометрического ДНК-содержащего БС основана, с одной стороны, на установленном нами высоком сродстве ионов Cu(II) к молекулам д-ИДНК, что позволяет провести эффективное концентрирование данных ионов из анализируемого раствора с малой концентрацией на мембране с д-ИДНК в составе БС. С другой стороны, в методике используется удаление ионов Cu(II) с поверхности БС обработкой его раствором комплексона III (используемым в токсикологии в качестве антидота [5]). Более высокая устойчивость комплекса Cu(II) – комплексон III по сравнению с оцененной нами устойчивостью комплекса Cu(II) – д-ИДНК позволяет реактивировать биочувствительную часть сенсора после концентрирования для много-

кратного использования БС и определить более низкие концентрации ионов металла в анализируемом растворе.

Для разработки метода реактивации ДНК-содержащего БС было изучено электрохимическое поведение комплекса Cu(II) с комплексоном III на СРПЭ. Для изучения природы аналитического сигнала, соответствующего восстановлению комплексоната Cu(II), было определено значение коэффициента скорости электродного процесса для раствора комплексоната металла. Полученные значения этого коэффициента (0.5–0.6) указывают на преимущественно диффузионный характер электродного процесса. Появление на вольтамперограмме катодного пика при –0.4 В после концентрирования ионов Cu(II) на БС и его реактивации еще раз подтверждает факт разрушения комплекса ионов Cu(II) с д-ИДНК под действием комплексона III. Величина этого сигнала зависит от концентрации ионов Cu(II), а при их постоянной концентрации – от биологической активности ДНК, т. е. способности ее нуклеотидов вступать в реакции комплексообразования с данными ионами. Было показано, что д-ДНК после иммобилизации является биологически активной и сохраняет свою активность не менее 30 дней. В течение всего этого времени отсутствует вымываемость д-ДНК из НЦ мембраны. Равенство аналитических сигналов, полученных при использовании различных участков мембраны с д-ИДНК равной площади, свидетельствует об однородности биочувствительной части сенсора по составу. Для сокращения времени проведения анализа было выбрано оптимальное время реактивации 20 мин., по истечении которого высота анализируемого пика комплексоната Cu(II) перестает увеличиваться. Следует также сказать, что при необходимости можно легко заменить мембрану после проведения анализа на новую.

3.3. Методика определения содержания ионов Cu(II) в модельных растворах с помощью амперометрического ДНК-содержащего БС. Амперометрический БС на основе д-ИДНК погружали в электрохимическую ячейку с раствором, содержащим ионы Cu(II) различной концентрации на 15 мин. Затем раствор ионов металла сливали, ячейку промывали фоновым раствором и заливали в нее 5 мл раствора (ФСБ рН 7.3), содержащего комплексон III с концентрацией $2.5 \cdot 10^{-2}$ моль/л, деаэрировали раствор током аргона в течение 20 мин. и снимали вольтамперограммы в интервале потенциалов от –0.02 В до –1.5 В ($E_0 = -0.02$ В, скорость наложения потенциала равна 0.5 В/с). Измеряли высоту катодного пика при потенциале –0.4 В для комплексоната Cu(II). По полученным данным строили градуировочный график зависимости тока восстановления комплексоната Cu(II) от концентрации ионов Cu(II). Уравнение градуировочного графика зависимости логарифма тока пика в мкА ($\lg I_n$) от логарифма концентрации Cu(II) в моль·л⁻¹ ($\lg c$) имеет следующий вид:

$$\lg I_n = (0.273 \pm 0.001) \lg c + (2.62 \pm 0.03), \quad r = 0.9996,$$

где r – коэффициент корреляции.

Полученный градуировочный график использовали для определения неизвестной концентрации ионов Cu(II) в модельных растворах. Линейная область

Табл. 2

Результаты определения ионов Cu(II) в модельных растворах с помощью амперометрического ДНК-содержащего БС ($n = 5, P = 0.95$)

Введено, $c \cdot 10^6$, моль/л	Найдено, $(c \pm \delta) \cdot 10^6$, моль/л	S_r
0.0001	0.00025 ± 0.00002	0.13
0.005	0.0047 ± 0.0001	0.08
0.01	0.011 ± 0.002	0.03
1.00	1.03 ± 0.04	0.03

определяемых концентраций ионов Cu(II) в модельных растворах с помощью БС на основе д-ИДНК составляет $1.0 \cdot 10^{-5} - 4.0 \cdot 10^{-11}$ моль/л для Cu(II). Нижняя граница определяемых содержаний составляет $4.0 \cdot 10^{-11}$ моль/л. Высокая чувствительность разработанной методики отражает высокое сродство ионов Cu(II) к д-ИДНК и высокие значения константы устойчивости образующегося комплекса. Результаты определения ионов Cu(II) в модельных растворах представлены в табл. 2.

Таким образом, результаты изучения процесса комплексообразования ионов Cu(II) с д-ИДНК, найденные оптимальные условия проведения анализа, широкий диапазон определяемых содержаний, возможность селективного определения ионов Cu(II) в присутствии электрохимически неактивных компонентов матрицы, либо восстанавливающихся в иной области потенциалов, позволяют использовать данный ДНК-содержащий БС как новое средство биохимического анализа и экологического контроля.

3.4. Применение амперометрического ДНК-содержащего БС в анализе природных вод и биологических объектов на содержание ионов Cu(II). Для оценки возможности использования разработанного амперометрического ДНК-содержащего БС как нового инструмента биохимического анализа и экоаналитического контроля при определении тяжелых металлов была разработана методика определения ионов Cu(II) в реальных объектах – в природной воде и сыворотке крови человека.

Определение содержания свободных ионов этого металла в сыворотке крови – актуальная задача аналитической химии. Как отмечалось выше, медь является жизненно необходимым элементом организма [2, 17, 24]. Она играет большую роль в образовании гемоглобина и эритроцитов, поскольку способствует внедрению железа в кольцо порфирина при образовании гема. В сыворотке крови ионы Cu(II) находятся в виде комплекса с α -глобулином, называемого церулоплазмином [24]. С другой стороны, при лейкозах, в основе которых, как известно, лежит злокачественное преобразование кроветворных клеток, организм человека теряет способность нормально включать медь в обмен веществ, в результате возникает гиперкупремия [24, 25]. Не исключено также попадание

Табл. 3

Результаты определения Cu(II) в реальных объектах с помощью амперометрического ДНК-содержащего БС ($n = 5, P = 0.95, t_{\text{табл}} = 2.78, F_{\text{табл}} = 6.39$)

Анализируемый объект	Вольтамперометрия на БС		Контрольный метод		$t_{\text{расч}}$	$F_{\text{расч}}$
	Найдено, $c \pm \delta$	s_r	Найдено, $c \pm \delta$	s_r		
Речная вода	$(0.44 \pm 0.05) \cdot 10^{-3}$ мг/мл	0.09	$(0.45 \pm 0.05) \cdot 10^{-3}$ мг/мл*	0.09	0.40	1.01
Озерная вода	$(0.28 \pm 0.03) \cdot 10^{-3}$ мг/мл	0.08	$(0.32 \pm 0.02) \cdot 10^{-3}$ мг/мл*	0.05	1.88	2.3
Сыворотка 1	$(1.6 \pm 0.1) \cdot 10^{-5}$ моль/л	0.05	$(1.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$ моль/л**	0.10	1.27	4.0
Сыворотка 2	$(3.5 \pm 0.2) \cdot 10^{-5}$ моль/л	0.05	$(3.3 \pm 0.3) \cdot 10^{-5}$ моль/л**	0.07	1.59	2.3

* атомно-абсорбционная спектрометрия.

** спектрофотометрия.

избыточного количества меди в организм из окружающей среды и среды промышленных предприятий [26].

Таким образом, необходима разработка методов контроля за содержанием ионов Cu(II) в сыворотке крови. Существующие методы определения содержания этих ионов в сыворотке крови методом атомно-абсорбционной спектрометрии, спектрофотометрии и вольтамперометрии длительны, трудоемки, требуют специальной пробоподготовки и дорогостоящего оборудования [20, 26]. Поэтому с учетом полученных в настоящей работе результатов спектрофотометрического и электрохимического исследования комплексообразования ионов Cu(II) с ДНК для решения данной задачи представляло интерес использовать ДНК-содержащий амперометрический БС.

При анализе сыворотки крови на содержание ионов Cu(II) в электрохимическую ячейку вводили 3 мкл сыворотки крови и все дальнейшие операции проводили, как описано в п. 2.4; для нахождения неизвестной концентрации ионов Cu(II) использовали градуировочный график. Выбранное значение pH 2.5 позволяет разрушить комплекс Cu(II)-церулоплазмин в сыворотке крови и сохранить ионы Cu(II) в негидролизованном состоянии [27].

Результаты определения представлены в табл. 3. В качестве контрольного метода при анализе природной воды использовали метод атомно-абсорбционной спектрометрии, а при анализе сыворотки крови – метод спектрофотометрии [26]. Расхождения между средними величинами концентраций ионов Cu(II) в экологических и биологических объектах, найденных двумя независимыми методами, незначимы и хорошо согласуются по t - и F -критериям (см. табл. 3).

Было установлено, что определению ионов Cu(II) не мешает присутствие таких ионов металлов, как Fe(II), Mg(II), Zn(II), Cu(II) и Al (III), в модельных растворах. Данные ионы металлов были выбраны в качестве матричных, так как они содержатся в сыворотке крови здорового человека в соизмеримых с ионами Cu(II) количествах и обладают достаточным сродством к молекулам ДНК [2, 20]. Предложенная методика на основе ДНК-содержащего БС для определения ионов Cu(II) в сыворотке крови отличается высокой чувствительностью, селективностью, хорошей воспроизводимостью, экспрессностью и простотой пробоподготовки. Данная методика может быть также использована как дополнительная к известным методам контроля содержания меди в организме человека, а также служить для определения содержания в биологических жидкостях онкопрепаратов на основе комплексов данного металла.

Таким образом, изучение комплексообразования д-ИДНК с ионами тяжелых металлов на примере ионов Cu(II) позволило, с одной стороны, выбрать оптимальную форму ДНК как биолиганда в составе амперометрического БС для определения тяжелых металлов в различных объектах, а, с другой стороны, определить количественные показатели такого взаимодействия, что позволяет целенаправленно использовать данный ДНК-содержащий БС как новое средство биохимического анализа и экологического контроля. С помощью такого БС возможно оценить потенциальную токсичность металлов для ДНК организма и предупредить последствия их воздействия, связанные с изменениями в молекулах ДНК.

Summary

S.S. Babkina, E.N. Moiseeva, Yu.I. Salnikov. The study of Cu(II)-DNA complex formation: the selection of the form of bioligand and conditions of Cu(II) determination with the biosensor.

The study of complex formation of heavy metals with different forms of deoxyribonucleic acid (DNA) has been made using Cu(II) as an example. The method of selection of optimum bioligand form for the immobilization in the biosensor has been proposed. The stability constants and composition of complexes of Cu(II) with different forms of DNA have been determined by spectrophotometric method. On the basis of obtained data the amperometric DNA-based biosensor has been developed for selective determination of Cu(II) in the ecological and biological objects (human blood serum). The proposed method characterized with high sensitivity and speed, good repeatability and simplicity of sample preparation.

Литература

1. *Зенгер В.* Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – М.: Мир, 1987. – 584 с.
2. *Эйхгорн Г.* (под ред.) Неорганическая биохимия. – М.: Мир, 1978. – 736 с.
3. *Благой Ю.П., Галкин В.Н., Гладченко Г.О.* Металлокомплексы нуклеиновых кислот в растворах. – Киев: Наукова думка, 1991. – 372 с.
4. *Андроникашвили Э.Л.* Малигнизация и изменение некоторых физико-химических свойств биомакромолекул и надмолекулярных структур // Биофизика.– 1987. – Т. 32, № 5. – С. 782–799.

5. *Зигель Х., Зигель А.* (под ред.) Некоторые вопросы токсичности ионов металлов. – М.: Мир, 1993. – С. 222–227.
6. *Кампанелла Л.* Некоторые причины возникновения опухолей: точка зрения химика-аналитика // Эксперим. онкология. – 2001. – Т. 23. – С. 76–77.
7. *Campanella L., Favero G., Mastrofini D., Tomassetti M.* Further developments in toxicity cell biosensors // Sensors Actuators. – 1997. – V 44. – P. 279–285.
8. *Lucarell F., Palchett I., Marrazza G., Mascini M.* Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples // Talanta. – 2002. – V. 56. – P. 949–957.
9. *Marrazza G., Chianella I., Mascini M.* Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring // Anal. Chim. Acta. – 1999. – V. 387. – P. 297–307.
10. *Babkina S.S., Medyantseva E.P., Budnikov H.C., Tyshlek M.P.* New variants of enzyme immunoassay of antibodies to DNA // Anal. Chem. – 1996. – V. 68, No 21. – P. 3827–3831.
11. *Бабкина С.С., Улахович Н.А., Зявкина Ю.И.* Анализ содержания платины в фарм-препаратах и биообъектах с помощью амперометрического биосенсора на основе дезоксирибонуклеиновой кислоты // Заводск. лаборатория. – 2000. – Т. 66, № 12. – С. 147–149.
12. *Бабкина С.С., Палечек Э., Йелен Ф., Фойта М.* Электрохимические сенсоры на основе стационарных электродов и иммобилизованной ДНК либо ее фрагментов и оценка их аналитических возможностей // Журн. аналит. химии. – 2005. – Т. 60, № 6. – С. 639–645.
13. *Budnikov H.C., Medyantseva E.P., Babkina S.S.* An enzyme amperometric sensor for toxicant determination // J. Electroanal. Chem. – 1991. – V. 310. – P. 49–55.
14. *Щербачева Э.С., Гольдштейн И.П., Кочешков К.А.* Метод обработки на ЭВМ результатов физико-химического исследования комплексных соединений в растворах // Изв. АН СССР. Сер. Хим. – 1975. – № 6. – С. 1262–1271.
15. *Shevelkova A.N., Salnikov Yu.I., Kuzmina N.L., Ryabov A.D.* Thermodynamic mechanism of catalysis by haloper-oxydases // FEBS Letters. – 1996. – V. 383. – P. 259–263.
16. *Новиков Ю.В., Ласточкина Ю.В., Болдина З.Е.* Методы исследования качества воды водоемов. – М.: Медицина, 1990. – С. 173–248.
17. *Удрис Г.А., Рем К.Г.* Биологическая роль меди. – Рига: Зинантне, 1990. – 337 с.
18. *Беркоу Р., Флетчер Э.М.* (под ред.) Руководство по медицине. – М.: Мир, 1997. – С. 771–878.
19. *Ленинджер А.* Биохимия. Молекулярные основы структуры и функции клеток. – М.: Мир, 1974. – 958 с.
20. *Туз Н.У.* (под ред.) Клиническая оценка лабораторных тестов. – М.: Медицина, 1986. – 480 с.
21. *Fojta M., Havran L., Kubicarova T., Palecek E.* Electrode potential-controlled DNA damage in the presence of copper ions and their complexes // Bioelectrochemistry. – 2002. – V. 55, No 17. – P. 25–27.
22. *Korbut O., Buckova M., Tarapcek P., Labuda J., Grundler P.* Damage to DNA indicated by an electrically heated DNA-modified carbon paste electrode // J. Electroanal. Chem. – 2001. – V. 506. – P. 143–148.
23. *Babkina S.S., Ulakhovich N.A.* Amperometric biosensor based on denatured DNA for the study of heavy metals complexing with DNA and their determination in biological, water and food samples // Abs. XVII Intern. symp. bioelectrochem. bioenerg. – Florence, Italy, 2003. – P. 194.

24. *Зигель Х.* Ионы металлов в биологических системах. – М.: Мир, 1982. – 165 с.
25. *Кодчайнова В.Н., Симонова Л.Н.* Медь. – М.: Наука, 1990. – 103 с.
26. *Архипова О.Г., Шацкая Н.Н., Семенова Л.С.* Методы исследования в профпатологии (биохимические). – М.: Медицина, 1988. – С. 123–125.
27. *Давыдов Д.Ю., Торопова В.В., Торопова Н.И., Титов А.С.* Гидролиз катионов металлов с образованием полиядерных гидроксокомплексов в растворах // Журн. неорг. химии. – 2005. – Т. 50, № 3. – С. 527–531.

Поступила в редакцию
16.01.06

Бабкина Софья Сауловна – доктор химических наук, профессор кафедры неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Сальников Юрий Иванович – доктор химических наук, профессор кафедры неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.

Моисеева Елена Николаевна – аспирант кафедры неорганической химии Химического института им. А.М. Бутлерова Казанского государственного университета.