

УДК 543.55:577.113.5/577.323.7

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ ДНК-СЕНСОРЫ НА ОСНОВЕ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБОК: ОБЗОР

*И.И. Никитина, О.В. Бондарь, Р.Р. Хазиахметова,
Ф.К. Алимова, Т.И. Абдуллин*

Аннотация

В настоящее время углеродные нанотрубки – один из самых популярных наноматериалов, активно тестируемых в разных областях науки и техники. Одним из динамично развивающихся приложений углеродных нанотрубок является разработка электрохимических/электронных биосенсоров. Мы представляем краткий обзор достижений в области создания на основе углеродных нанотрубок электрохимических биосенсоров для анализа нуклеиновых кислот как носителей генетической информации. Особое внимание уделено оригинальным разработкам, проводимым на кафедре биохимии Казанского государственного университета.

Введение

В последние годы важным объектом биомедицинских и биоаналитических исследований становятся наноматериалы, чьи уникальные структурные и физико-химические свойства служат основой создания новых или улучшения существующих методов диагностики и лечения заболеваний человека [1]. Одним из наиболее перспективных в этом отношении материалов являются углеродные нанотрубки (УНТ), которые обладают механической прочностью, химической инертностью, большой площадью поверхности и совместимостью с биомакромолекулами и клетками. Эти свойства, в частности, обуславливают актуальность применения УНТ в тканевой инженерии и для конструирования имплантантов [2–4], а также для создания вакцин и лекарственных препаратов [5, 6].

Большое внимание исследователи уделяют разработке на основе углеродных нанотрубок диагностических ДНК-сенсоров [7–10], предназначенных для экспрессного выявления бактериальных/вирусных инфекций и генетических нарушений, обуславливающих развитие заболеваний человека [11–13]. Другое актуальное применение ДНК-сенсоров включает изучение генотоксического эффекта химических и физических факторов по изменению структурного состояния нуклеиновых кислот [11, 12]. Оба направления активно развиваются в рамках электрохимических биосенсоров, которые отличаются высокой селективностью и чувствительностью и служат платформой для создания коммерчески доступных биочипов [11–13]. Высокоорганизованная наноструктура и разнообразные электронные свойства УНТ делают перспективным использование этого материала для создания подобных биочипов в качестве как структурного, так и преобразующего элементов [8, 14].

1. Конфигурации электрохимических преобразователей на основе углеродных нанотрубок

Выделяют два типа углеродных нанотрубок – одностенные и многостенные, отличающиеся по строению и свойствам (рис. 1). Идеальная одностенная (однослойная)

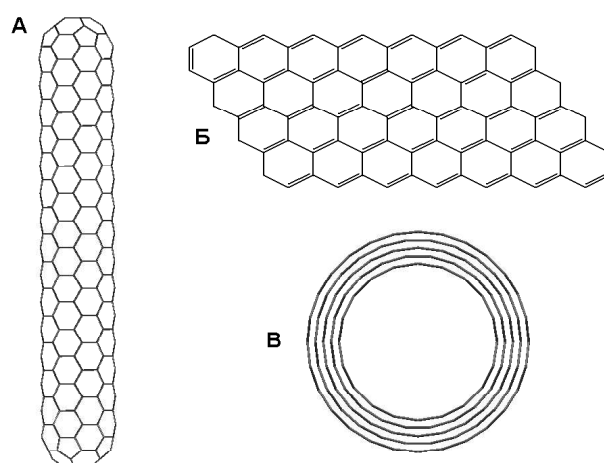


Рис. 1. Схематическое строение одностенной углеродной нанотрубки (А – вид сбоку), плоскости графита (Б) и многостенной углеродной нанотрубки (В – вид сверху)

УНТ (рис. 1, А) образована свернутой в трубку графитовой плоскостью (рис. 1, Б) и покрыта на концах полусферическими головками, структурно гомологичными фуллерену С₆₀. В отличие от одностенных, многостенные УНТ состоят из нескольких вложенных друг в друга концентрических графитовых трубок (рис. 1, В), расстояние между которыми, как и в графите, составляет почти 0,34 нм. Внешний диаметр нанотрубок варьируется от 0,4 до 2,0 нм для одностенных УНТ и от 1,4 до 100 нм для многостенных УНТ, в то время как длина обоих типов УНТ может достигать нескольких мкм [8, 14, 15]. В зависимости от диаметра и степени хиральности («закрученности» вокруг своей оси) одностенные УНТ могут обладать металлической проводимостью или свойствами полупроводника, в то время как многостенные УНТ характеризуются только металлической проводимостью [8, 14–16]. Для более подробного ознакомления с методами синтеза и свойствами УНТ мы рекомендуем обзоры [8, 14–20].

Одной из главных задач при разработке электрохимических ДНК-сенсоров с использованием УНТ является конструирование соответствующих преобразователей – электродов. Существует два подхода в изготовлении электродов из УНТ: первый заключается в «простой» модификации нанотрубками обычных электродов, второй – в создании электродных массивов (*electrode arrays*) из ориентированных УНТ [8, 9, 14]. Наиболее простой способ изготовления электрода на основе УНТ включает в себя механическое смешивание препарата одно- или многостенных УНТ с минеральным маслом или с твердым материалом и введение получаемой композиции в полость пастового электрода [21–23]. Преимуществом этого способа является отсутствие необходимости растворения УНТ и возможность регенерации поверхности модифицированного электрода посредством его механической полировки. Вместе с тем создание пастового электрода, как правило, не предполагает удаления из УНТ примесей аморфного углерода и металлического катализатора, содержащихся в синтезированных препаратах УНТ [8, 16, 24, 25].

Для решения этой проблемы УНТ подвергают интенсивному окислению, которое одновременно способствует удалению примесей и придает гидрофильные свойства УНТ, которые очень гидрофобны по природе [14, 24, 25]. Нами предложен способ модификации обычного стеклоуглеродного электрода (СУЭ) углеродными нанотрубками, подвергнутыми предварительному окислению в смеси азотной и

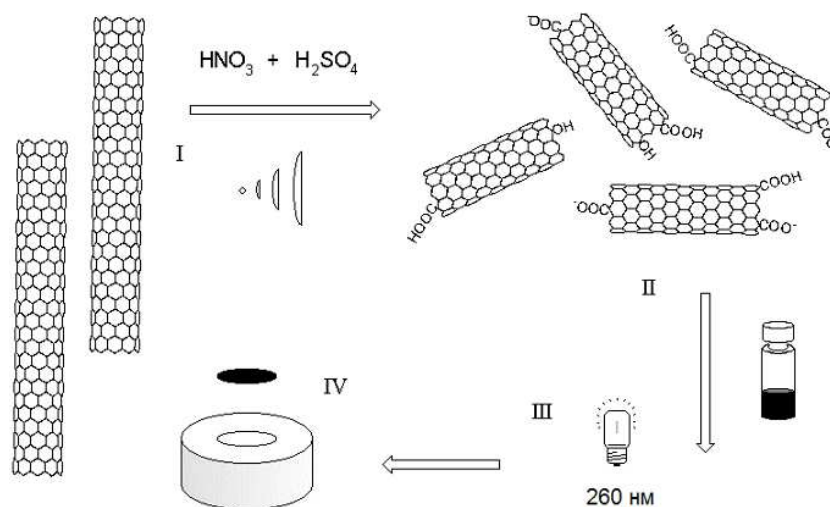


Рис. 2. Схема модификации стеклоглеродного электрода углеродными нанотрубками [28]: I – окисление УНТ в сочетании с ультразвуковой обработкой; II – осаждение окисленных УНТ; III – измерение оптической плотности суспензии УНТ; IV – нанесение УНТ на электрод

серной кислот [26–29]. Действие этой смеси в сочетании с ультразвуковым диспергированием (рис. 2, I) приводит к разрезанию стенок нанотрубок и к образованию концевых кислородсодержащих групп, что позволяет получать стабильные суспензии УНТ в полярных растворителях, включая воду. Водная суспензия УНТ интенсивно поглощает свет в УФ-области с характерным для ароматических соединений максимумом $\lambda_{\max} = 260$ нм (рис. 2, III), что позволяет оценивать концентрацию УНТ спектрофотометрически. СУЭ модифицируют, помещая на рабочую поверхность аликвоту суспензии УНТ с последующим удалением растворителя (рис. 2, IV). В результате на СУЭ формируется однородное модифицирующее покрытие из УНТ. Топографическое изображение этого покрытия, полученное с помощью атомно-силовой микроскопии, показано на рис. 3. Изготовленные по приведенной схеме СУЭ модифицированные УНТ характеризуются воспроизводимыми электрохимическими свойствами [28, 29].

Описаны сходные способы модификации электродов углеродными нанотрубками, в которых окисленные или неокисленные УНТ диспергируют ультразвуком в присутствии полиэлектролита, например, нафiona [30], поли(диаллилдиметиламмония) [31], полиэтиленimina [32], полисахаридов и др. [33, 34]. Эта процедура, сопровождаемая адсорбцией (био)полимера на поверхности нанотрубки, стабилизирует УНТ в суспензии, а в некоторых случаях позволяет отделять УНТ от побочных продуктов синтеза [34]. Наноконпозиты УНТ и катионных (био)полимеров, используемые в качестве модификатора, одновременно служат удобной матрицей для иммобилизации на электроде отрицательно заряженных нуклеиновых кислот посредством электростатической адсорбции [31, 33].

Микро- и нанoeлектродные массивы из УНТ создают путем ковалентной иммобилизации гидрофильных УНТ (по концу нанотрубки) на химически модифицированном электроде (рис. 4) или *in situ* синтеза УНТ на поверхности металлического субстрата, содержащего предварительно осажденные споты катализатора. В последнем случае массив обычно погружают в матрицу из диоксида кремния или другого диэлектрика для изоляции индивидуальных электродов и увеличения проч-

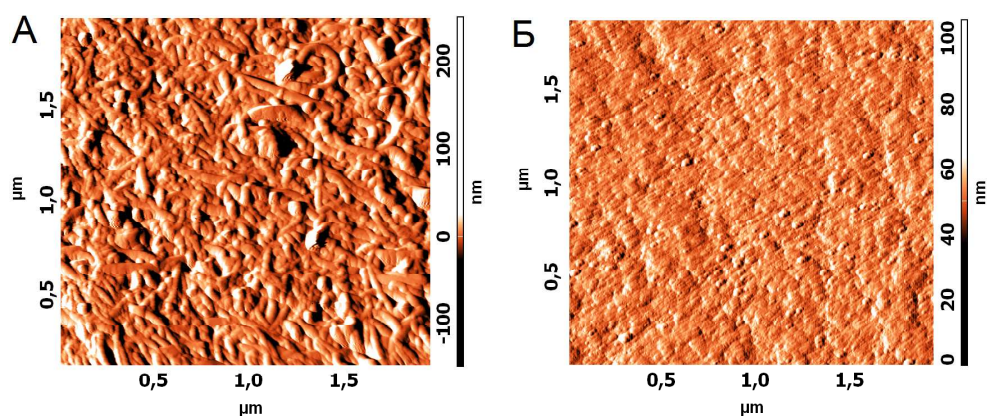


Рис. 3. Топографические изображения модифицирующего слоя углеродных нанотрубок (А) и полированного стеклоглерода (Б), полученные с помощью атомно-силовой микроскопии [28]

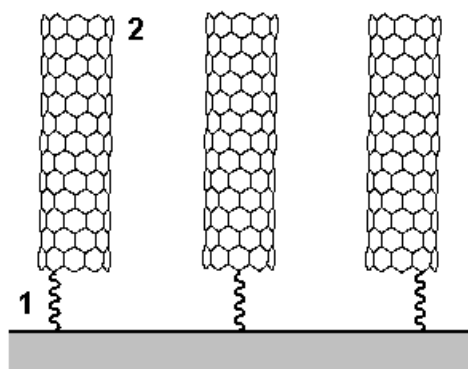


Рис. 4. Поверхность химически модифицированного электрода (1) с ковалентно иммобилизованными вертикально ориентированными углеродными нанотрубками (2)

ности конструкции. Электродные массивы, состоящие из пространственно организованных (вертикальных) УНТ, являются перспективными преобразователями для конструирования высокочувствительных и селективных биосенсоров/биочипов нового поколения [8, 9, 35, 36].

Одним из главных преимуществ преобразователей на основе УНТ является их необычно высокая чувствительность к электроактивным анализам по сравнению с традиционными углеродными и металлическими электродами [8, 14, 22, 23, 28, 29]. Этот факт объясняется большой эффективной площадью поверхности УНТ и их способностью ускорять электрохимические реакции с низкой скоростью переноса электронов [8, 14].

В качестве примера на рис. 5 приведены вольтамперограммы окисления аскорбиновой кислоты и L-цистеина на чистом СУЭ и СУЭ, покрытом УНТ. Модификация электрода нанотрубками приводит к значительному уменьшению перенапряжения исследуемых реакций наряду с увеличением регистрируемого тока. Это свидетельствует об актуальности применения УНТ в электрохимических биосенсорах для увеличения чувствительности, а в некоторых случаях и о селективности детектирования биомолекул.

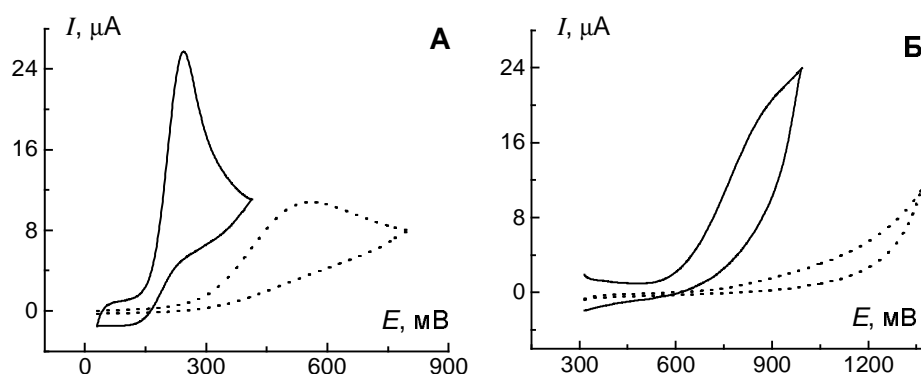


Рис. 5. Циклические вольтамперограммы аскорбиновой кислоты (А) и L-цистеина (Б) на чистом СУЭ (пунктирные линии) и СУЭ, модифицированном УНТ (сплошные линии). Ацетатный буферный раствор (рН 5.0), скорость сканирования 100 мВ/с, концентрация биомолекул $1.5 \cdot 10^{-3}$ М [28]

2. Анализ первичной структуры ДНК с использованием электродов, модифицированных углеродными нанотрубками

Ключевым направлением развития электрохимических ДНК-сенсоров является создание генетических биосенсоров, предназначенных для быстрого анализа первичной структуры нуклеиновых кислот. В таком *геносенсоре* биораспознающим компонентом служит *зонд* – одноцепочечный олигонуклеотид, комплементарный определенной последовательности исследуемой ДНК (мишени). В результате специфического взаимодействия (гибридизации) ДНК-зонда, иммобилизованного на поверхности преобразователя, с участком ДНК-мишени образуется двойная спираль – ДНК-дуплекс. К настоящему времени предложено несколько универсальных способов электрохимической регистрации этого процесса, которые, в частности, основаны на использовании редокс-активных индикаторов гибридизации (рис. 6) или ковалентно связанных с ДНК меток, а также на прямом детектировании нуклеотидов в ДНК [11–13].

Одним из первых был разработан ДНК-сенсор, в котором в качестве преобразователя применен модифицированный углеродными нанотрубками стеклоуглеродный электрод [37]. Модельный 24-членный олигонуклеотид, несущий 5'-линкер с концевой аминогруппой, ковалентно иммобилизовали на модифицированном электроде после обработки УНТ водорастворимым карбодиимидом. Взаимодействие ДНК-зонда с исследуемой последовательностью ДНК контролировали с помощью интеркалирующего антибиотика дауномицина, детектируемого при потенциале около +0.3 В. Дауномицин предпочтительнее связывается с двуцепочечной ДНК, чем с одноцепочечной, поэтому в результате гибридизации он концентрируется на поверхности биосенсора, а регистрируемый сигнал резко увеличивается (рис. 6). Взаимодействие биосенсора с некомплементарными последовательностями сопровождается заметно меньшим изменением сигнала [37].

При другом способе для создания ДНК-сенсора использовали электрод из вертикально ориентированных УНТ, который отжигали в плазме и далее химически пришивали к обработанным УНТ олигонуклеотидный зонд с концевой аминогруппой. Исследуемой ДНК служила модельная 20-мерная последовательность, модифицированная редокс-меткой – производным ферроцена. Авторами продемонстрирована возможность чувствительного детектирования ДНК-мишени на поверхности созданного биосенсора по току окисления ферроценовой метки [38].

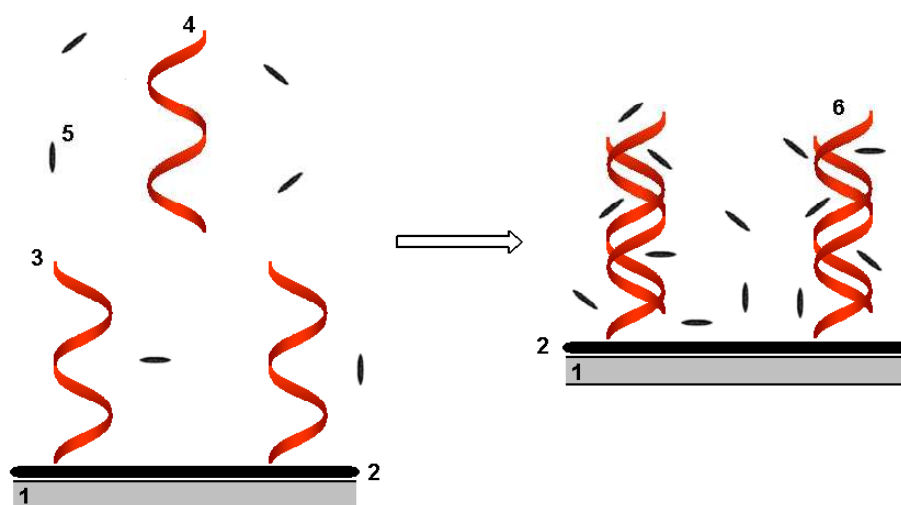


Рис. 6. Детектирование ДНК с помощью электрохимического геносенсора, основанное на использовании индикаторов гибридизации: 1 – поверхность электрода; 2 – модифицирующий слой УНТ; 3 – иммобилизованный ДНК-зонд; 4 – исследуемая ДНК (мишень); 5 – электрохимически активный индикатор; 6 – образующийся в результате гибридизации ДНК-дуплекс

Разработан протокол определения 19-мерной последовательности онкогена BRCA1, ассоциированного с раком молочной железы, с применением в качестве метки щелочной фосфатазы. Гибридизацию иммобилизованного зонда с биотинилированной ДНК-мишенью и последующее связывание образующегося дуплекса с конъюгатом щелочная фосфатаза-стрептавидин проводили на поверхности магнитных микрочастиц. Активность связанной с микрочастицами щелочной фосфатазы, пропорциональную концентрации исследуемой ДНК, регистрировали по накоплению в пробе электроактивного продукта α -нафтола. Использование электрода, модифицированного УНТ, позволяет значительно увеличить чувствительность детектирования ферментативной реакции вследствие сильной адсорбции α -нафтола на УНТ. Предел обнаружения последовательности-мишени в зависимости от условий анализа составил от 40 до 10 ppt [39].

Применение УНТ для конструирования преобразователей является не единственным приложением УНТ в биосенсорах. Уникальные структурные особенности УНТ предполагают возможность иммобилизации на нанотрубке большого числа меток, генерирующих мощный аналитический сигнал. Так, в группе Вонга [40, 41] предложен оригинальный подход, основанный на химической модификации поверхности УНТ молекулами щелочной фосфатазы и использовании полученного комплекса как «супер-метки» для ультрачувствительного выявления гибридационных и иммунохимических взаимодействий. Благодаря адсорбции на УНТ продукта фосфатазной реакции α -нафтола генерируемый такой меткой сигнал можно дополнительно усилить, модифицируя электрод углеродными нанотрубками. Подобная двойная амплификация с помощью УНТ позволяет уменьшить предел обнаружения ДНК-мишени до концентрации 1 фг/мл (54 аМ), что соответствует 820 копиям ДНК в 25 мкл пробы [40]. В рамках этого подхода предложен другой способ получения метки УНТ-фермент, в котором на поверхность нанотрубки поочередно адсорбируют слои положительно заряженного поли(диаллилдиметиламмония) и щелочной фосфатазы, имеющей отрицательный заряд. Такая иммобилизация спо-

способствует увеличению поверхностной нагрузки фермента на УНТ по сравнению с ковалентной сшивкой, что позволяет понизить предел детектирования анализируемой последовательности ДНК с помощью комплексной метки до 80 копий (5.4 аМ) [41].

Ли и др. [36, 42] изготовили наноэлектродный чип, содержащий 9 параллельных массивов из *in situ* синтезированных вертикально ориентированных УНТ, погруженных в слой диоксида кремния. После химической блокировки поверхности массива и электрохимического окисления УНТ-электродов на открытом конце нанотрубок ковалентно иммобилизовали 18-нуклеотидный зонд, комплементарный участку BRCA1. Связывание зонда с ДНК-мишенью, содержащей 300 нуклеотидов, контролировали, регистрируя ток окисления гуанинового компонента мишени с участием медиатора дипиридилного комплекса рутения. Используемый зонд вместо гуанинового нуклеотида содержал его аналог, электрохимически неактивный инозин. По данным авторов, с помощью разработанного биочипа можно напрямую детектировать менее 1000 копий анализируемой ДНК в микрообъеме пробы. Высокая чувствительность обусловлена сочетанием наноэлектродной конструкции биочипа, каталитического действия УНТ и медиаторной реакции [36, 42].

Рассмотренные выше данные демонстрируют перспективность создания биосенсоров и биочипов для анализа первичной последовательности нуклеиновых кислот с применением преобразователей на основе УНТ. Среди отмеченных способов детектирования ДНК следует выделить электрохимическое окисление нуклеотидов, используя которое можно не только определять ДНК напрямую, но также выявлять изменения во вторичной структуре ДНК под действием различных факторов [11, 12, 43]. Вместе с тем развитие биосенсоров, основанных на электроактивных свойствах ДНК, сдерживается из-за низкой чувствительности детектирования нуклеотидов, окисление которых протекает при высоких потенциалах и характеризуется низкой скоростью переноса электронов [44, 45]. Использование УНТ для создания соответствующих биосенсоров является эффективным решением этой проблемы благодаря способности УНТ катализировать медленные электрохимические реакции с участием биомолекул (рис. 5). Нашей группой впервые в стране начаты разработки ДНК-сенсоров, основанных на электрохимических свойствах нуклеиновых кислот и их компонентов на электродах, модифицированных УНТ [26–29]. В следующем параграфе рассмотрены принципы работы и перспективы применения подобных биосенсоров.

3. Электрохимические свойства ДНК на электродах, модифицированных углеродными нанотрубками

Исследования последних лет, в том числе проведенные нами, показывают, что УНТ сильно изменяют электрохимическое поведение нуклеиновых кислот и их компонентов [26–29, 46–55]. Известно, что на электроде легче детектировать пурины, которые окисляются при потенциале около +0.8 В для гуанина и +1.0 В для аденина, гуаниновых нуклеозидов/нуклеотидов. Детектирование адениновых нуклеотидов и пиримидинов, имеющих более высокие потенциалы окисления, обычно затруднено из-за относительно высокого фонового тока на электродах, модифицированных УНТ [29, 52, 53].

Установлено, что гуанин и аденин [27, 46, 53–55], а также гуаниновые нуклеотиды [27, 29, 55] претерпевают интенсивную адсорбцию на электродах, покрытых УНТ или композитами на основе УНТ, которая как правило, не проявляется на других углеродных электродах. Учитывая данные из литературы по адсорбции ароматических соединений на УНТ [56–58], можно предположить, что наблюда-

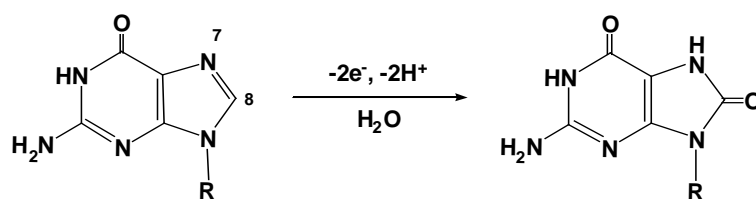


Рис. 7. Схема двухэлектронного окисления гуанина (R – H) и дезоксигуанозинмонофосфата (R – дезоксирибозилфосфат)

емое в отмеченных выше работах связывание пуринов с электродами на основе УНТ обусловлено гидрофобными и стэкинг-взаимодействиями между пуриновым гетероциклом и стенкой УНТ. При этом азотистые основания, вероятно, имеют плоскую ориентацию на УНТ, а на модифицированном нанотрубками электроде формируют мономолекулярные слои [55].

Электрохимические реакции с участием азотистых оснований и их производных на электродах, модифицированных УНТ, служат моделью, предсказывающей поведение ДНК. Нами выяснены особенности окисления гуанина и дезоксигуанозинмонофосфата (дГМФ) как наиболее вероятных редокс-центров ДНК на электроде, покрытом предварительно окисленными многостенными УНТ [52, 55]. На этом электроде исследуемые пурины окисляются через стадию образования 8-оксопроизводных интермедиатов, детектируемых при более низком потенциале, чем соответственно гуанин и дГМФ. Эти интермедиаты появляются в результате отрыва двух электронов от наиболее нуклеофильной -N7=C8-связи пуринового гетероцикла (рис. 7). Известно, что 8-оксопроизводные гуанина образуются также при окислении ДНК *in vivo*, и они являются важными маркерами повреждения ДНК [59, 60]. Результаты предполагают возможность использования электродов, модифицированных УНТ, для моделирования редокс-процессов с участием ДНК и детектирования продуктов окислительного повреждения ДНК [52, 55].

В отличие от азотистых оснований и их производных, полинуклеотиды обладают вторичной структурой, затрудняющей электроокисление нуклеотидов в составе нуклеиновых кислот. Поэтому на обычных электродах, в том числе из углеродных материалов, ДНК обладает низкой электрохимической активностью [61, 62] или не проявляет таковую [29, 52, 55]. По данным работ [47–50], на электродах, содержащих как одностенные, так и многостенные углеродные нанотрубки, ДНК и РНК окисляются интенсивно. Очевидно, этот факт обусловлен наноструктурированностью границы раздела фаз модифицированного нанотрубками электрода, которая способствует адсорбции биополимера и облегчает его окисление [55]. Имеются сведения о том, что важная роль в электрохимических реакциях ДНК принадлежит кислородсодержащим группам, присутствующим в структурных дефектах УНТ или образующимся у УНТ в результате их физико-химической обработки [49].

В серии наших работ [26–29, 51–55, 63] содержатся результаты комплексного исследования, включающего конструирование и тестирование электродов, модифицированных УНТ, последующее изучение электрохимического поведения ДНК на этих электродах в зависимости от структуры биополимера и создание различных типов ДНК-сенсоров. Показано, что электроактивным компонентом в ДНК является гуаниновый нуклеотид, ток окисления которого можно использовать в качестве сигнала для прямого определения ДНК и характеристики ее структуры. В частности, этот сигнал сильно зависит от вторичной структуры ДНК и увеличивается как после термической денатурации ДНК, так и в результате ее обработки денатурирующими агентами [29, 54, 55]. При этом электроды, модифи-

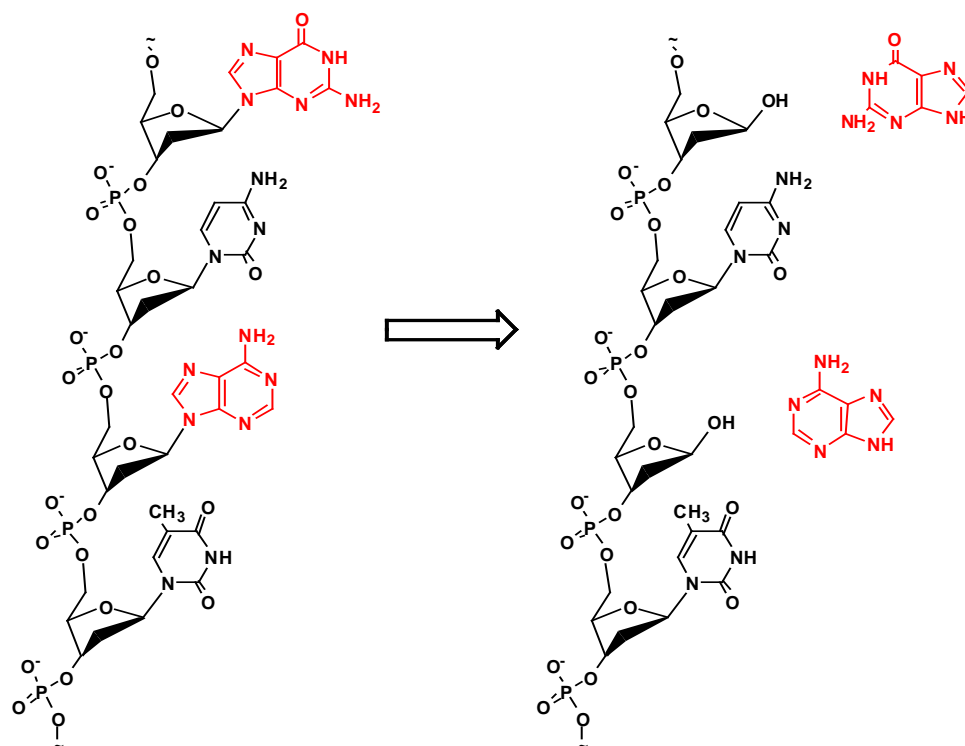


Рис. 8. Схема депуризации ДНК

цированные УНТ, часто позволяют регистрировать изменения в структуре ДНК, не выявляемые с помощью традиционных методов (электрофореза в агарозном геле и др.). Высокая чувствительность электродов на основе УНТ к структурному состоянию ДНК, вероятно, объясняется сильной адсорбцией на нанотрубках азотистых оснований денатурированных (одноцепочечных) участков биополимера. Это свидетельствует о возможности применения разработанных электродов для оценки качества препаратов ДНК, используемых в биохимических исследованиях, и для изучения эффекта соединений, изменяющих структуру ДНК.

Как показано в [29, 52, 53, 55], препараты нативной ДНК содержат примесь свободного гуанина, обнаруживаемого на вольтамперограммах ДНК при более низком потенциале. Количество такого гуанина резко увеличивается после термической денатурации ДНК, свидетельствуя о том, что термическая обработка ДНК сопровождается ее депуринизацией – высвобождением пуриновых оснований (рис. 8). Известно, что депуринизация является распространенным процессом *in vivo*, который может приводить к потере генетической информации и к мутациям [64, 65]. С использованием электродов на основе УНТ нами разработан экспрессный способ количественной оценки депуринизации нуклеиновых кислот по высвобождаемому гуанину. В отличие от традиционных методов, он не требует хроматографического разделения и концентрирования продуктов депуринизации [53, 55].

В другом исследовании [55, 63] электроды, модифицированные УНТ, использованы в качестве преобразователя для создания ДНК-сенсора на активные формы кислорода – главного эндогенного источника повреждений ДНК [66, 67]. После иммобилизации нативной ДНК на модифицированном электроде ДНК-сенсор инкубировали в растворе, содержащем гидроксил-радикал, генерированный по реакции Фентона [66]. Такая обработка приводит к резкому увеличению тока окисления

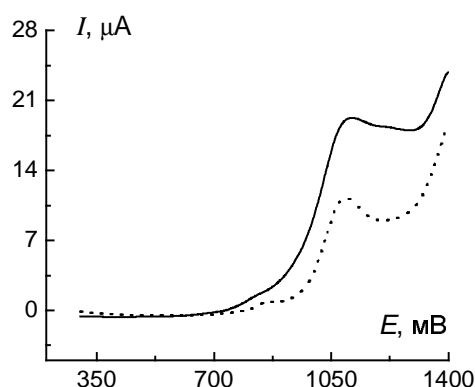


Рис. 9. Изменение сигнала окисления нативной ДНК, иммобилизованной на модифицированном углеродными нанотрубками электроде, после обработки биосенсора реактивом Фентона: пунктирная линия – нативная ДНК (контроль); сплошная линия – обработанная ДНК [55]

ДНК по сравнению с контролем (необработанная ДНК) вследствие повреждения ДНК гидроксил-радикалом (рис. 9).

Согласно данным [66], гидроксил-радикал вызывает гидролиз сахарофосфатной цепи в результате окисления остатка дезоксирибозы. Этот процесс является вероятной причиной изменения сигнала биосенсора, так как он сопровождается расщеплением ДНК и в результате – улучшением ее адсорбции на модифицированном электроде. Разработанный ДНК-сенсор на основе УНТ можно использовать для изучения генотоксического действия взаимодействующих с ДНК антибиотиков и ксенобиотиков [55, 63].

Заключение

Электроды на основе углеродных нанотрубок являются новым типом электрохимических преобразователей, преимущество которых перед обычными электродами заключается в высокой чувствительности, в возможности миниатюризации и использования как для непрямого, так и для прямого детектирования ДНК. Такие преобразователи являются многообещающей платформой для создания генетических ДНК-сенсоров и чипов, а также уникальным инструментом для изучения молекулярных взаимодействий с участием нуклеиновых кислот.

Summary

I.I. Nikitina, O.V. Bondar, R.R. Khaziakhmetova, F.K. Alimova, T.I. Abdullin. Electrochemical DNA sensors based on carbon nanotubes: A review.

Currently, carbon nanotubes are one of the most popular nanomaterials intensely studied in various fields of science and technology. One of the rapidly developing applications of carbon nanotubes is electrochemical/electronic biosensor construction. The present article briefly reviews the recent advances in carbon nanotube-based technology of constructing electrochemical biosensors for analysis of nucleic acids. Particular attention has been paid to original studies carried out at the Department of Biochemistry, Kazan State University.

Литература

1. *Salata O.V.* Applications of nanoparticles in biology and medicine // *J. Nanobiotechnol.* – 2004. – V. 2. – P. 3–8.

2. *Zanello L.P., Zhao B., Hu H., Haddon R.C.* Bone cell proliferation on carbon nanotubes // *Nano Lett.* – 2006. – V. 6. – P. 562–567.
3. *Abarrategi A., Gutierrez M.C., Moreno-Vicente C., Hortiguela M.J., Ramos V., Lopez-Lacomba J.L., Ferrer M.L., Monte F.* Multiwall carbon nanotube scaffolds for tissue engineering purposes // *Biomaterials.* – 2008. – V. 29. – P. 94–102.
4. *Harrison B.S., Atala A.* Carbon nanotube applications for tissue engineering // *Biomaterials.* – 2007. – V. 28. – P. 344–353.
5. *Pantarotto D., Partidos C.D., Hoebeke J., Brown F., Kramer E., Briand J.-P., Muller S., Prato M., Bianco A.* Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses // *Chem. Biol.* – 2003. – V. 10. – P. 961–966.
6. *Bianco A., Hoebeke J., Godefroy S., Chaloin O., Pantarotto D., Briand J.-P., Muller S., Prato M., Partidos C.D.* Cationic carbon nanotubes bind to CpG oligodeoxynucleotides and enhance their immunostimulatory properties // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – V. 127. – P. 58–59.
7. *Wang J.* Nanomaterial-based electrochemical biosensors // *Analyst.* – 2005. – V. 130. – P. 421–426.
8. *Merkoci A., Pumera M., Llopis X., Perez B., Valle M., Alegret S.* New materials for electrochemical sensing VI: Carbon nanotubes // *Trends Anal. Chem.* – 2005. – V. 24. – P. 826–838.
9. *Balasubramanian K., Burghard M.* Biosensors based on carbon nanotubes // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2006. – V. 385. – P. 452–468.
10. *Pumera M., Sanchez S., Ichinose I., Tang J.* Electrochemical nanobiosensors // *Sens. Actuators, B.* – 2007. – V. 123. – P. 1195–1205.
11. *Wang J.* Survey and summary. From DNA biosensors to gene chips // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – V. 28. – P. 3011–3016.
12. *Kerman K., Kobayashi M., Tamiya E.* Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology // *Meas. Sci. Technol.* – 2004. – V. 15. – P. R1–R11.
13. *Lucarelli F., Marrazza G., Turner A.P.F., Mascini M.* Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors // *Biosens. Bioelectron.* – 2004. – V. 19. – P. 515–530.
14. *Gooding J.J.* Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing // *Electrochim. Acta.* – 2005. – V. 50. – P. 3049–3060.
15. *Paradise M., Goswami T.* Carbon nanotubes – Production and industrial applications // *Mater. Design.* – 2007. – V. 28. – P. 1477–1489.
16. *Niyogi S., Hamon M.A., Hu H., Zhao B., Bhowmik P., Sen R., Itkis M.E., Haddon R.C.* Chemistry of single-walled carbon nanotubes // *Acc. Chem. Res.* – 2002. – V. 35. – P. 1105–1113.
17. *Grobert N.* Carbon nanotubes – becoming clean // *Nanotoday.* – 2007. – V. 10. – P. 28–35.
18. *Harris P.J.F.* Solid state growth mechanisms for carbon nanotubes // *Carbon.* – 2007. – V. 45. – P. 229–239.
19. *Елецкий А.В.* Углеродные нанотрубки // *Усп. физ. наук.* – 1997. – Т. 167, № 9. – С. 945–972.
20. *Елецкий А.В.* Сорбционные свойства углеродных нанотрубок // *Усп. физ. наук.* – 2004. – Т. 174, № 11. – С. 945–972.

21. *Valentini F., Amine A., Orlanducci S., Terranova M.L., Paleschi G.* Carbon nanotube purification: preparation and characterization of carbon nanotube paste electrodes // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 75. – P. 5413–5421.
22. *Wang J., Musameh M.* Carbon nanotube/teflon composite electrochemical sensors and biosensors // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 75. – P. 2075–2079.
23. *Rubianes M.D., Rivas G.A.* Carbon nanotubes paste electrode // *Electrochem. Commun.* – 2003. – V. 5. – P. 689–694.
24. *Liu J., Rinzler A.G., Dai H., Hafner J.H., Bradley R.K., Boul P.J., Lu A., Iverson T., Shelimov K., Huffman C.B., Rodriguez-Macias F., Shon Y.S., Lee T.R., Colbert D.T., Smalley R.E.* Fullerene pipes // *Science.* – 1998. – V. 280. – P. 1253–1256.
25. *Raymundo-Pinero E., Cacciaguerra T., Simon P., Beguin F.* A single step process for the simultaneous purification and opening of multiwalled carbon nanotubes // *Chem. Phys. Lett.* – 2005. – V. 412. – P. 184–189.
26. *Никитина И.И., Абдуллин Т.И.* Электроды, модифицированные углеродными нанотрубками, для детектирования биомолекул // *Материалы VI науч. конф. молодых ученых, аспирантов и студентов НОЦ КГУ «Материалы и технологии XXI века».* – Казань, 2006. – С. 85.
27. *Abdullin T.I., Budnikov G.K., Evtugyn G.A., Konovalova O.A., Salakhov M.Kh.* Voltammetric behavior of guanine, guanosine triphosphate and DNA on carbon nanotubes modified electrodes // *Abstr. of Internat. Congress on Analytical Sciences “ICAS-2006”.* – M., 2006. – P. 620–621.
28. *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.
29. *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.
30. *Tkac J., Ruzgas T.* Dispersion of single walled carbon nanotubes. Comparison of different dispersing strategies for preparation of modified electrodes toward hydrogen peroxide detection // *Electrochem. Commun.* – 2006. – V. 8. – P. 899–903.
31. *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.
32. *Rubianes M.D., Rivas G.A.* Dispersion of multi-wall carbon nanotubes in polyethylenimine: A new alternative for preparing electrochemical sensors // *Electrochem. Commun.* – 2007. – V. 9. – P. 480–484.
33. *Li J., Liu Q., Liu Y., Liu S., Yao S.* DNA biosensor based on chitosan film doped with carbon nanotubes // *Anal. Biochem.* – 2005. – V. 346. – P. 107–114.
34. *Moulton S.E., Minett A.I., Murphy R., Ryan K.P., McCarthy D., Coleman J.N., Blau W.J., Wallace G.G.* Biomolecules as selective dispersants for carbon nanotubes // *Carbon.* – 2005. – V. 43. – P. 1879–1884.
35. *Koehne J., Li J., Cassell A.M., Chen H., Ye Q., Ng H.T., Han J., Meeyappan M.* The fabrication and electrochemical characterization of carbon nanotube nanoelectrode arrays // *J. Mater. Chem.* – 2004. – V. 14. – P. 676–684.
36. *Li J., Ng H.T., Cassell A., Fan W., Chen H., Ye Q., Koehne J., Han J., Meeyappan M.* Carbon nanotube nanoelectrode array for ultrasensitive DNA detection // *Nano Lett.* – 2003. – V. 3. – P. 597–602.

37. *Cai H., Cao X., Jiang Y., He P., Fang Y.* Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2003. – V. 375. – P. 287–293.
38. *He P., Dai L.* Aligned carbon nanotube–DNA electrochemical sensors // *Chem. Commun.* – 2004. – V. 3. – P. 348–349.
39. *Wang J., Kawde A.-N., Jan M.R.* Carbon-nanotube-modified electrodes for amplified enzyme-based electrical detection of DNA hybridization // *Biosens. Bioelectron.* – 2004. – V. 20. – P. 995–1000.
40. *Wang J., Liu G., Jan M.R.* Ultrasensitive electrical biosensing of proteins and DNA: carbon-nanotube derived amplification of the recognition and transduction events // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – V. 126. – P. 3010–3011.
41. *Munge B., Liu G., Collins G., Wang J.* Multiple enzyme layers on carbon nanotubes for electrochemical detection down to 80 DNA copies // *Anal. Chem.* – 2005. – V. 77. – P. 4662–4666.
42. *Koehne J., Chen H., Li J., Cassell A.M., Ye Q., Ng H.T., Han J., Meeyappan M.* Ultrasensitive label-free DNA analysis using an electronic chip based on carbon nanotube nanoelectrode arrays // *Nanotechnology.* – 2003. – V. 14. – P. 1239–1245.
43. *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. Pharm. Biomed. Anal.* – 2005. – V. 37. – P. 205–217.
44. *Armistead P.M., Thorp H.H.* Modification of indium tin oxide electrodes with nucleic acids: Detection of attomole quantities of immobilized DNA by electrocatalysis // *Anal. Chem.* – 2000. – V. 72. – P. 3764–3770.
45. *Oliveira-Brett A.M., Piedade J.A.P., Silva L.A., Diculescu V.C.* Voltammetric determination of all DNA nucleotides // *Anal. Biochem.* – 2004. – V. 332. – P. 321–329.
46. *Wang Z., Xiao S., Chen Y.* β -Cyclodextrin incorporated carbon nanotubes-modified electrodes for simultaneous determination of adenine and guanine // *J. Electroanal. Chem.* – 2006. – V. 589. – P. 237–242.
47. *Liu H., Wang G., Chen D., Zhang W., Li C., Fang B.* Fabrication of polythionine/NPAu/MWNTs modified electrode for simultaneous determination of adenine and guanine in DNA // *Sens. Actuators B.* – 2008. – V. 128. – P. 414–421.
48. *Pedano M.L., Rivas G.A.* Adsorption and electrooxidation of nucleic acids at carbon nanotubes paste electrodes // *Electrochem. Commun.* – 2004. – V. 6. – P. 10–16.
49. *Heng L.Y., Chou A., Yu J., Chen Y., Gooding J.J.* Demonstration of the advantages of using bamboo-like nanotubes for electrochemical biosensor applications compared with single walled carbon nanotubes // *Electrochem. Commun.* – 2005. – V. 7. – P. 1457–1462.
50. *Erdem A., Papakonstantinou P., Murphy H.* Direct DNA hybridization at disposable graphite electrodes modified with carbon nanotubes // *Anal. Chem.* – 2006. – V. 78. – P. 6656–6659.
51. *Nikitina I.I., Bondar O.V., Khaziakhmetova R.R., Rizvanov A.A., Abdullin T.I.* Carbon nanotubes based direct electrochemical detection of nucleic acids // *Abstr. of the Third Intern. Conf. “Basic Science for Medicine”.* – Novosibirsk, 2007. – P. 156.
52. *Бондарь О.В., Никитина И.И., Хазиахметова Р.Р., Ризванов А.А., Абдуллин Т.И.* Оценка структурного состояния ДНК с помощью электрохимических биосенсоров // *Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки.* – 2007. – Т. 149, кн. 4. – С. 106–111.
53. *Абдуллин Т.И., Никитина И.И., Бондарь О.В.* Выявление депуринизации ДНК с помощью модифицированного углеродными нанотрубками электрода // *Журн. аналит. химии.* – 2008. – Т. 63, № 4. – в печати.

54. *Бондарь О.В., Хазиахметова Р.Р., Абдуллин Т.И.* Адсорбция пуринов и ДНК на углеродных нанотрубках // Сб. ст. по итогам XIV Всерос. конф. «Структура и динамика молекулярных систем». – Казань, 2007. – С. 379–382.
55. *Абдуллин Т.И.* Адсорбция и окисление дезоксирибонуклеиновых кислот на электродах, модифицированных углеродными нанотрубками: Дис. ... канд. биол. наук. – Казань: Казан гос. ун-т, 2007. – 142 с.
56. *Basiuk E.V., Rybak-Akimova E.V., Basiuk V.A., Acosta-Najarro D., Saniger J.M.* Adsorption modification of single-walled carbon nanotubes with tetraazaannulene macrocyclic complexes // *Nano Lett.* – 2002. – V. 2. – P. 1249–1252.
57. *Yan Y., Zhang M., Gong K., Su L., Guo Z., Mao L.* Adsorption of methylene blue dye onto carbon nanotubes: A route to an electrochemically functional nanostructure and its layer-by-layer assembled nanocomposite // *Chem. Mater.* – 2005. – V. 17. – P. 3457–3463.
58. *Rajendra J., Baxendale M., Rap L.G.D., Rodger A.* Flow linear dichroism to probe binding of aromatic molecules and DNA to single-walled carbon nanotubes // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – V. 126. – P. 11182–11188.
59. *Martinis B.S., Bianchi M.L.P.* Methodology for urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine analysis by HPLC with electrochemical detection // *Pharmacol. Res.* – 2002. – V. 46. – P. 129–131.
60. *Collins A.R., Cadet J., Moller L., Poulsen H.E., Vinae J.* Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2004. – V. 423. – P. 57–65.
61. *Brabec V., Koudelka J.* Oxidation of deoxyribonucleic acid at carbon electrodes. The effect of the quality of the deoxyribonucleic acid sample // *Bioelectrochem. Bioenerg.* – 1980. – V. 7. – P. 793–805.
62. *Pedano M.L., Rivas G.A.* Immobilization of DNA on glassy carbon electrodes for the development of affinity biosensors // *Biosens. Bioelectron.* – 2003. – V. 18. – P. 269–277.
63. *Никитина И.И., Абдуллин Т.И.* Биосенсоры на основе углеродных нанотрубок для выявления повреждений в ДНК // Сб. ст. по итогам XIV Всерос. конф. «Структура и динамика молекулярных систем». – Казань, 2007. – С. 777–780.
64. *Lindahl T., Nyberg B.* Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid // *Biochemistry.* – 1972. – V. 11. – P. 3610–3618.
65. *Sheppard T.L., Ordoukhanian P., Joyce G.F.* A DNA enzyme with N-glycosylase activity // *PNAS.* – 2000. – V. 97. – P. 7802–7807.
66. *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.
67. *Cadet J., Delatour T., Douki T., Gasparutto D., Pouget J.-P., Ravamat J.-L., Sauvaigo S.* Hydroxyl radicals and DNA base damage // *Mutat. Res.* – 1999. – V. 424. – P. 9–21.

Поступила в редакцию
24.09.07

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

E-mail: nikitinairi@mail.ru

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

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

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

Алимова Фарида Кашифовна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: *farida_alimova@hotmail.com*

Абдуллин Тимур Илдарович – ассистент кафедры биохимии Казанского государственного университета.

E-mail: *timur.abdullin@ksu.ru*