

УДК 543.9+571.27

**АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИЙ ДНК-СЕНСОР
НА ОСНОВЕ ПЛАНАРНЫХ ЗОЛОТЫХ ЭЛЕКТРОДОВ,
МОДИФИЦИРОВАННЫХ СОПОЛИМЕРОМ
ТИРАМИНА И О-АМИНОФЕНОЛА**

*А.В. Порфирьева, Е.Е. Стойкова, С.В. Белякова,
Г.А. Евтюгин, Г.К. Будников*

Аннотация

Разработаны амперометрические ДНК-сенсоры на основе нативной ДНК и олигонуклеотидов, иммобилизованных в белковой пленке и сополимере тирамина и *о*-аминофенола на поверхности золотых тонкопленочных планарных электродов. ДНК-сенсоры позволяют определять присутствие в растворе 0.01–10 нмоль комплементарных олигонуклеотидных последовательностей (мишеней) по изменению амперометрического сигнала маркеров – метиленового синего и гидрохинона, регистрируемого в серии измерений из одного раствора. Обсуждается влияние нативной ДНК и ДНК-зонда на электрохимическое поведение маркеров в различных условиях измерения сигнала и вклад специфических и неспецифических взаимодействий маркеров с компонентами модифицирующего слоя сенсора.

Введение

Изучение взаимодействий дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) с биологически активными соединениями, в том числе с белками и низкомолекулярными эффекторами, является неотъемлемой частью исследования многих фундаментальных научных проблем. К ним относятся изучение механизмов генных мутаций, репарационных процессов, разработка новых высокоэффективных лекарственных препаратов, используемых в генной терапии и лечении онкологических заболеваний [1, 2]. Одним из подходов к решению указанных проблем является сочетание ДНК как элементов биохимического распознавания с химическими сенсорами, преобразующими биохимический сигнал в электрический. Подобные устройства, названные ДНК-сенсорами, находят применение в биомедицинских исследованиях для диагностики микробиальных и вирусных патогенов [3, 4]. В них используется явление гибридизации – многоточечного связывания комплементарных последовательностей олигонуклеотидов, один из которых (ДНК-зонд) иммобилизован на поверхности преобразователя сигнала, а второй (мишень) представляет собой последовательность, специфичную для диагностируемого генетического материала. Такие «гибридизационные» ДНК-сенсоры отличаются высокой специфичностью сигнала, практически исключая ошибку в определении природы биологической мишени.

Экспрессность и себестоимость регистрации гибридационных взаимодействий зависят от выбранного способа измерения аналитического сигнала. Для этого разработаны методы флуоресцентного [5] и пьезометрического (масс-селективного [6]) детектирования. Электрохимическая регистрация сигнала выгодно отличается от указанных методов более простым протоколом измерения, использованием стандартного измерительного оборудования (иономеров и вольтамперографов), а также низкой себестоимостью единичного определения.

На сегодняшний день для электрохимической регистрации взаимодействия ДНК-зонда и мишени применяется три подхода. Это измерение токов окисления гуанидиновых фрагментов ДНК [7], использование меток, ковалентно связанных с концевыми фрагментами ДНК (ферроцены [8], ферменты [9]), а также низкомолекулярных маркеров, добавляемых в анализируемый раствор и взаимодействующих с ДНК на поверхности электрода электростатически или по механизму интеркалирования [10–12]. Взаимодействия меняют характеристики маркеров в силу изменения их доступности для электродной реакции в результате внедрения в состав спирали двунитевой ДНК, образующейся в результате гибридизации либо электростатических взаимодействий с отрицательно заряженным фосфатным остовом ДНК. Чаще всего в качестве маркеров используют интеркаляторы – противораковые препараты антрациклинового ряда – дауномицин и адриамицин, а также фенотиазиновый краситель метиленовый синий. В то же время вещества, взаимодействующие с ДНК преимущественно электростатически, изучены недостаточно. Они выгодно отличаются от интеркаляторов обратимостью взаимодействия с ДНК и меньшими рабочими потенциалами измерения сигнала, что позволяет использовать соответствующие ДНК-сенсоры многократно и исключить влияние на их сигнал легко окисляющихся компонентов пробы. В данной работе нами предложен новый ДНК-сенсор на основе золотых планарных тонкопленочных электродов для регистрации гибридационных взаимодействий по изменению сигнала метиленового зеленого и гидрохинона, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами неспецифически (электростатически) и ранее в составе ДНК-сенсора не изучавшихся.

1. Экспериментальная часть

1.1. Материалы и оборудование. Использовали высокополимеризованную дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК, натриевая соль) из эритроцитов цыплят (Reanal, Венгрия) и следующие олигонуклеотиды, синтезированные в НПФ «Литех», Москва:

- ДНК-зонд – TGTAAGCCCCGCATTGCTC, аминированный по 3'-терминальному концу;
- мишени: комплементарная зонду – GAGCAATGCGGGCTTTACA и некомплементарная зонду – TTTTTTTTTTTTTTTTTT (dT₂₀).

В качестве электрохимически активного индикатора использовали метиленовый зеленый (Aldrich, Германия). Для получения матрицы для иммобилизации ДНК-зонда и нативной ДНК использовали тирамин гидрохлорид и *o*-аминофенол (Aldrich, Германия). Тирамин использовали без дополнительной очистки, *o*-аминофенол очищали возгонкой в вакууме непосредственно перед ис-

пользованием. Измерения проводили в 0.002 М фосфатном буферном растворе, содержащем 0.1 М сульфат натрия.

Амперометрический сигнал ДНК-сенсора измеряли с помощью вольтамперометрического анализатора BAS CV-51W (Bioanalytical Systems, Inc., США) в режиме линейной и квадратно-волновой вольтамперометрии. Электродом сравнения служил хлоридсеребряный электрод Ag/AgCl (BAS), противэлектродом – никелевая фольга 1 см².

Для изготовления ДНК-сенсора использовали компакт-диски, предварительно очищенные от поверхностного защитного слоя с помощью 50% азотной кислоты. Для этого рабочую поверхность компакт-диска смачивали раствором азотной кислоты 1:1, после прекращения газовой выделения промывали дистиллированной водой и механически нарезали на сегменты требуемого размера (порядка 3 × 1 см). Сегменты зажимали между верхней и нижней половин разборной ячейки, выполненной из политетрафторэтилена (рис. 1). Выемка в верхней части ячейки служила рабочей ячейкой объемом 0.5 мл. Противэлектрод закрепляли вдоль вертикальных стенок ячейки. Геометрическая площадь рабочей поверхности электрода составляла 0.07 см².

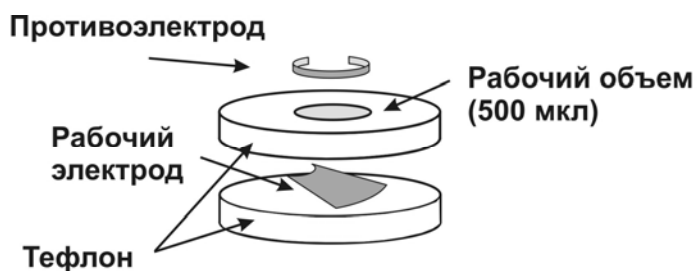


Рис. 1. Разборная ячейка для измерения сигнала ДНК-сенсора на основе планарного тонкопленочного золотого электрода (винты для скрепления верхней и нижней частей ячейки не показаны)

Электрохимические измерения также проводили в стандартной ячейке объемом 5 мл на дисковых золотых электродах (BAS) диаметром 3 мм.

1.2. Изготовление биосенсоров. Для включения биологических компонентов в белковую матрицу на золотой электрод наносили 3 мкл раствора ДНК (0.025 мг/мл), подсушивали до образования пленки, поверх наносили 3 мкл 0.01 % раствора желатина и после подсушивания – 3 мкл 1% глутарового альдегида. Электрод сушили в потоке воздуха при комнатной температуре 10 мин., затем промывали в дистиллированной воде и высушивали. Готовые ДНК-сенсоры хранили в сухом виде при 4°C.

Для включения биологических компонентов в полимерную матрицу сначала проводили электрополимеризацию мономеров тирамина и *o*-аминофенола на золотом электроде. Для этого 0.965 г тирамина растворяли в 10 мл этанола, разбавляли в 4 раза рабочим буферным раствором и корректировали pH до величины 6.0. Готовили раствор 5 мг *o*-аминофенола в 0.5 мл дистиллированной воды, добавляли 2 мкл концентрированной серной кислоты. В рабочую ячейку

заливали по 250 мкл раствора тирамина и *o*-аминофенола, опускали противозлектрод и электрод сравнения и проводили циклирование потенциала между -800 и $+800$ мВ отн. Ag/AgCl. После окончания электролиза ячейку и электроды промывали водой и фосфатным буферным раствором.

Для нанесения на образующееся покрытие нативной ДНК в ячейку на 30 мин. вносили 500 мкл 2.5% глутарового альдегида, далее промывали водой и наносили 6 мкл смеси, приготовленной из 10 мкл раствора нативной ДНК (0.0334 мг/мл), 2 мкл 2.5% глутарового альдегида и 6 мкл 0.05% нафина. Электрод сушили в токе воздуха при комнатной температуре.

ДНК-зонд перед иммобилизацией предварительно нагревали в термостате до 95°C в течение 5 мин. и переносили на 2 мин. в ледяную баню, после чего иммобилизовали, как описано выше для нативной ДНК. Содержание зонда в поверхностном слое электрода составляло 2.8 нмоль/см².

Для модификации электрода альбумином на электрод, покрытый сополимером тирамина и *o*-аминофенола, наносили 6 мкл смеси, приготовленной из 10 мкл 5% водного раствора альбумина, 2 мкл 2.5% глутарового альдегида и 6 мкл 0.5% нафина. Электрод сушили в токе воздуха при комнатной температуре.

1.3. Измерение сигнала биосенсоров. Для измерения тока окисления метиленового зеленого в ячейку добавляли фосфатный буферный раствор, pH 6.9, помещали противозлектрод и электрод сравнения и регистрировали фоновую вольтамперограмму в режиме квадратно-волновой вольтамперометрии в диапазоне от -500 до $+100$ мВ (амплитуда 25 мВ, частота 15 Гц). Добавляли раствор метиленового зеленого, раствор перемешивали и повторяли измерение. Рабочим сигналом сенсора являлась абсолютная величина тока пика окисления метиленового зеленого, измеренного относительно фоновой кривой. После измерения биосенсор отмывали, не разбирая ячейки, при катодной поляризации рабочего электрода при -180 мВ.

Измерение сигнала гидрохинона проводили в аналогичных условиях в режиме постоянноточковой вольтамперометрии в диапазоне от -200 до $+800$ мВ. После измерения ячейку промывали рабочим буферным раствором. Градуировочные зависимости маркеров получали методом последовательных добавок.

Для регистрации измерения гибридизации олигонуклеотиды-мишени предварительно подвергали термической обработке, как описано выше для ДНК-зонда, и далее добавляли в ячейку. После инкубирования ячейку промывали, добавляли рабочий буферный раствор и проводили 10 последовательных измерений сигнала индикаторов – 6.0 мМ гидрохинона или 60 мкМ метиленового зеленого.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Электрохимическое поведение маркеров. Метиленовый зеленый окисляется на чистых золотых дисковых и планарных электродах, образуя на вольтамперограммах два пика окисления. Один из пиков имеет сорбционную природу, его высота слабо зависит от концентрации деполяризатора и монотонно возрастает с увеличением времени контакта электрода с метиленовым

зеленым. Высота второго пика стабилизируется в течение 3–5 мин. инкубирования. Его высота линейно зависит от концентрации маркера в интервале 20 мкМ – 0.5 мМ.

С увеличением концентрации метиленового зеленого возрастает прочность его связывания с электродом. Это приводит к увеличению фонового тока при отмывке электрода после измерения сигнала. Если потенциал окончания сканирования увеличить с +500 до +800 мВ, происходит частичная полимеризация маркера. Об этом говорит появление острого необратимого пика в области больших потенциалов, высота которого возрастает при многократном циклировании потенциала. Поскольку при этом ухудшаются метрологические характеристики измерения сигнала, в последующих измерениях величину максимального потенциала сканирования ограничивали значением +500 мВ.

Для регенерации поверхности электрода после его контакта с метиленовым зеленым нами предложен способ электрохимического удаления избытка деполяризатора с поверхности электрода, заключающийся в поляризации электрода при потенциале пика тока окисления (–150 мВ) в течение 5–10 мин. После этого электрод промывали буферным раствором. Качество отмывки контролировали по величине фонового тока, регистрируемого в рабочем буферном растворе в отсутствие маркера.

Нанесение на поверхность золотого электрода нативной ДНК и ДНК-зонда в белковой матрице с последующей кросс-сшивкой глутаровым альдегидом не меняет общего вида вольтамперных кривых. Это позволяет судить о постоянстве механизма окисления метиленового зеленого. Относительная высота сорбционного пика несколько снижается по сравнению с чистым электродом.

При введении ДНК или ДНК-зонда в поверхностный слой происходит увеличение абсолютной величины тока окисления метиленового зеленого и его чувствительности к концентрации деполяризатора. Этот эффект закономерно нарастает по мере увеличения содержания ДНК и ДНК-зонда в поверхностном слое до 0.1 мкг ДНК и 0.2 нмоль ДНК-зонда на электрод. По-видимому, указанные значения соответствуют полному заполнению поверхности электрода, так что дальнейшее повышение концентрации биологических компонентов не приводит к увеличению числа доступных для метиленового зеленого центров связывания на поверхности сенсора. Все последующие измерения сигнала ДНК-сенсора проводили при указанных количествах модификаторов в поверхностном слое. Аналитические характеристики определения метиленового зеленого на электродах с различными модифицирующими слоями в оптимальных условиях приведены в табл. 1.

2.2. Регистрация гибридизационных взаимодействий. При введении в раствор модельных мишеней, комплементарных и некомплементарных олигонуклеотидной последовательности ДНК-зонда, ток окисления метиленового зеленого менялся в зависимости от состава поверхностного слоя. В случае иммобилизации ДНК и ДНК-зонда в белковой матрице в случае комплементарного олигонуклеотида наблюдается снижение тока окисления маркера, при введении в раствор некомплементарного олигонуклеотида dT₂₀ – увеличение. При этом максимальное изменение сигнала, наблюдаемое при введении модельных

Табл. 1

Аналитические характеристики определения метиленового зеленого на золотых электродах, модифицированных нативной ДНК и ДНК-зондом $i = a + b \cdot C$

Модификатор	a	b	R	i_{\max} , мкА*
Золотой электрод	$3.15 \cdot 10^{-8}$	0.00104	0.9860	0.23
Нативная ДНК (0.1 мкг на электрод)	$8.90 \cdot 10^{-8}$	0.01061	0.98926	0.7
ДНК-зонд (0.2 нмоль на электрод)	$-6.62 \cdot 10^{-8}$	0.01406	0.99102	1.2

* Максимальное значение тока в интервале линейности градуировочного графика.

олигонуклеотидов в раствор, составило 30% от исходной величины сигнала, регистрируемой в отсутствие олигонуклеотидов.

В литературе упоминается сходный принцип регистрации гибридизации на поверхности сенсора по изменению тока окисления аналога метиленового зеленого – метиленового синего. При этом изменение регистрируемых токов после контакта с комплементарным зонду олигонуклеотидом составляло до 80% исходного сигнала в близких экспериментальных условиях [11, 12]. Различие в поведении фенотиозиновых красителей может быть связано с тем, что метиленовый синий, действуя как интеркалятор, внедряется в спираль двунитевой ДНК. Это ограничивает его доступность для электродной реакции. Напротив, метиленовый зеленый координируется в основном по поверхности спирали ДНК в результате электростатических взаимодействий с противоположно заряженными фосфатными группами остова ДНК. Для него наблюдаемые изменения сигнала могут быть связаны с изменением в результате гибридизации диффузионной проницаемости поверхностного слоя (уменьшением скорости переноса маркера к электроду) и с варьированием прочности связывания маркера на поверхности олигонуклеотидов в результате комплементарного связывания мишени. Первый фактор уменьшает скорость переноса маркера к электроду, второй – его увеличивает. В результате общее изменение сигнала метиленового зеленого в результате гибридизации, протекающей на поверхности электрода, оказывается невелико.

Повышение чувствительности регистрации гибридизационных процессов на поверхности ДНК-сенсора может быть достигнуто при более плотной упаковке ДНК-зонда в поверхностном слое. С этой целью вместо белковой пленки для иммобилизации ДНК-зонда был использован сополимер тирамина и ряда замещенных фенолов. Ранее нами было показано, что электрополимеризация тирамина позволяет получить покрытие электрода, отличающееся высокой емкостью в отношении ферментов, ковалентно связываемых с аминокеттогруппами боковых алифатических цепей полимера с помощью глутарового альдегида [14]. Однако политирамин, образующийся в процессе циклирования потенциала электрода, характеризовался низкой электропроводностью. Его образование сопровождалось снижением регистрируемых токов и искажением формы пиков на вольтамперограммах маркеров. Кроме того, политирамин обладал недостаточной адгезией к золотому электроду, отслаиваясь в процессе регистрации пришивки ДНК или при отмывке электродов. Поэтому нами были изучены

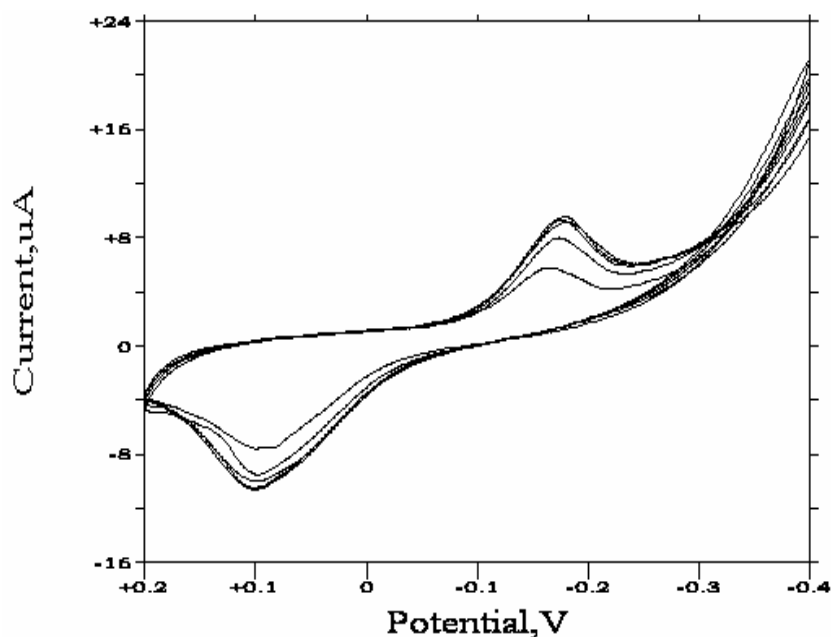
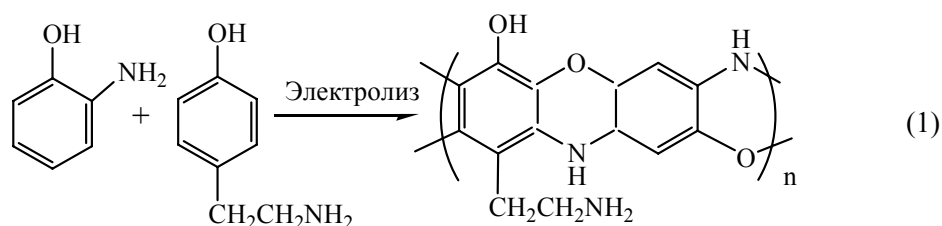


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы эквимольной смеси *o*-аминофенола и тирамина в 0.1 М серной кислоте

смешанные полимерные покрытия, включающие, помимо тирамина, производные фенола. Наилучшие результаты были получены с использованием эквимольной смеси тирамина и *o*-аминофенола. Получаемые пленки отличались плотным строением и высокой диффузионной проницаемостью для низкомолекулярных соединений. В качестве примера на рис. 2 представлены вольтамперограммы, полученные при первых пяти циклах электрополимеризации в 0.1 М серной кислоте. В процессе роста пленки полимера происходит закономерное увеличение тока сопряженных пиков окисления/восстановления на 20–25 и 35–40% для второго и третьего цикла соответственно, после чего токи стабилизируются.

Для повышения адгезии пленки к материалу электрода и механической устойчивости покрытия было также предложено покрывать электрод до проведения полимеризации дополнительным слоем нафiona – катионообменного материала, способствующего закреплению на электроде положительно заряженного полимера. Нанесение нафiona увеличило срок службы модифицированного электрода до нескольких недель и стабилизировало токи маркера. Процесс полимеризации и предположительный состав полимерного покрытия приведены на схеме:



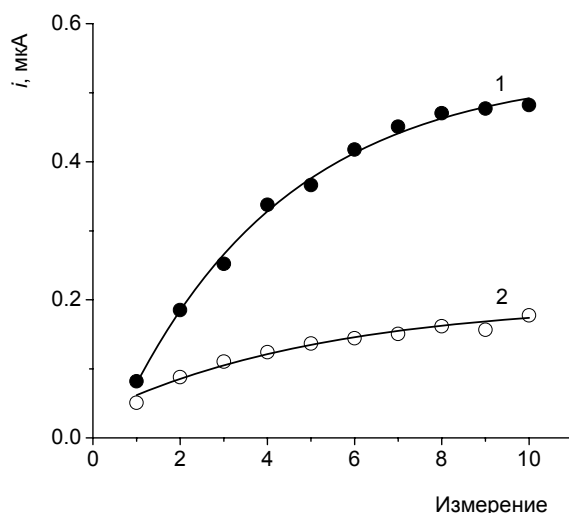


Рис. 3. Изменение тока пика окисления метиленового зеленого на электроде, модифицированном сополимером тирамина и *o*-аминофенола, в присутствии нативной ДНК (1) и альбумина (2) в серии измерений из одного раствора. Концентрация маркера 60 мкМ

Токи окисления метиленового зеленого, зарегистрированные на электроде, покрытом смешанным полимерным покрытием тирамина и *o*-аминофенола, линейно зависят от концентрации маркера в интервале 0.02–0.45 мМ.

Если на поверхности сополимера тирамин – *o*-аминофенол иммобилизована нативная ДНК, сигнал окисления метиленового зеленого в серии последовательных измерений из одного раствора закономерно увеличивался в силу специфического накопления маркера в комплексе с ДНК. Если ДНК из поверхностного слоя исключить, добавив для постоянства его массы альбумин, изменение сигнала маркера в серии измерений из одного раствора менее значительно и связано, по-видимому, с неспецифической сорбцией маркера. Типичные кривые изменения отклика сенсора в серии последовательных измерений из одного и того же раствора маркера приведены на рис. 3.

После отмывки электрода и смены раствора маркера характер изменения его сигнала в присутствии ДНК не меняется. В присутствии альбумина вместо ДНК при смене раствора сигнал метиленового зеленого стабилизируется, по-видимому, в силу насыщения центров неспецифического связывания.

Чтобы учесть вклад неспецифической сорбции метиленового зеленого, измерения были проведены с использованием другого маркера – гидрохинона, инертного в отношении биологических компонентов поверхностного слоя. Зависимости изменения сигнала в серии последовательных измерений приведены на рис. 4.

Как видно из рисунка, в серии последовательных измерений из одного раствора депольризатора происходит быстрая стабилизация сигнала окисления гидрохинона в присутствии альбумина и ДНК-зонда (0.26 нмоль на электрод), тогда как в присутствии нативной ДНК происходит линейное увеличение тока для 10 последовательных измерений. Таким образом, помимо абсолютных значений регистрируемых токов маркеров, о гибридизации, происходящей на по-

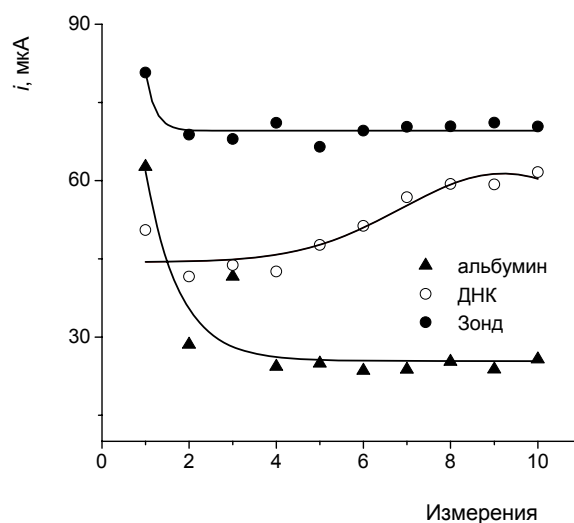


Рис. 4. Зависимость сигнала электрода, модифицированного сополимером тирамина и *o*-аминофенола, от числа измерений и природы биологического компонента поверхностного слоя. Гидрохинон 6.0 мМ

верхности сенсора с участием ДН-зонда, можно судить по изменению сигналов маркеров в нескольких последовательных измерениях.

Таким образом, проведенные эксперименты позволили предложить следующий критерий для установления факта гибридизации на поверхности электрода: в серии последовательных измерений из одного раствора должно происходить увеличение регистрируемого тока маркера, сигнал стабилизируется к восьмому–двенадцатому измерению.

Для проверки предложенного способа определения комплементарных олигонуклеотидных последовательностей нами были проведены измерения сигнала гидрохинона после инкубирования биосенсора в растворе комплементарного олигонуклеотида различной концентрации. Абсолютное значение сигнала и его изменение в серии последовательных измерений закономерно возрастали с концентрацией мишени в интервале концентраций 0.001–10 нМ. Наибольшие изменения наблюдались для второго измерения в серии (рис. 5). Полученная зависимость носит сигмоидный характер. Верхний предел изменения тока соответствует эквимольному содержанию ДНК-зонда и мишени в реакционной смеси. Напротив, при добавлении dT_{20} вместо увеличения сигнала наблюдается его снижение на 10–20% от исходного значения. Это согласуется с предположением, что неспецифическая сорбция меняет сигнал маркера в направлении, противоположном влиянию гибридизационных процессов.

3. Выводы

Применение сополимера тирамина и *o*-аминофенола для иммобилизации нативной ДНК и 29-мерного ДНК-зонда существенно улучшило аналитические характеристики ДНК-сенсора. Это выражается в увеличении диапазона изменения аналитического сигнала и более высокой чувствительности регистрации

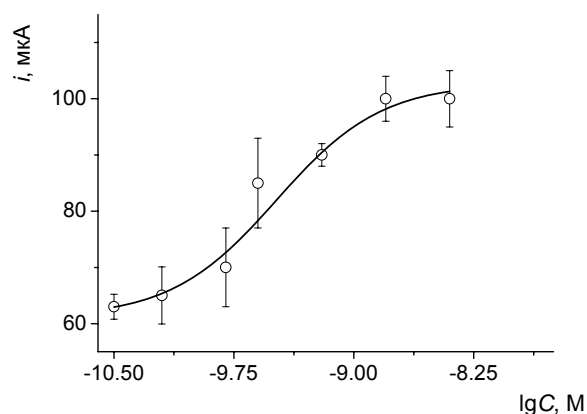


Рис. 5. Зависимость тока окисления гидрохинона (второе измерение в серии, проводимой из одного раствора) от концентрации комплементарного ДНК-зонду олигонуклеотида. Гидрохинон 6.0 мМ

гибридизации по сравнению с использованием для иммобилизации белковой матрицы. Изменение сигнала маркеров в серии последовательных измерений из одного раствора обусловлено, по-видимому, разным характером накопления электрохимически активных компонентов в поверхностном слое биосенсора. Оно более чувствительно к природе биологической мишени и позволяет различать комплементарные и некомплементарные олигонуклеотидные последовательности в количествах, сопоставимых с нагрузкой ДНК-зонда на электрод. Использование оригинальной разборной ячейки и планарных тонкопленочных золотых электродов позволило уменьшить объем анализируемой пробы и упростить процедуру измерения. Разработанный ДНК-сенсор позволяет определять присутствие 0.001–10 нмоль комплементарных олигонуклеотидов.

Авторы выражают благодарность НПФ «Литех», г. Москва, за предоставленные для исследования олигонуклеотиды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 06-03-32217-а, 05-03-33162-а).

Summary

A.V. Porfirieva, E.E. Stoikova, S.V. Beljakova, G.A. Evtugyn, H.C. Budnikov. Amperometric DNA-sensor based on planar Au electrodes modified with tyramine and *o*-aminophenol copolymer.

Amperometric DNA-sensors based on native DNA and DNA probes immobilized in the protein film or in the copolymer of tyramine and *o*-aminophenol on the surface of thin-film Au planar electrodes. DNA-sensors developed make it possible to detect 0.01–10 nanomoles of complementary oligonucleotides in the solution tested. The detection is based on the changes of amperometric signals of the markers, i. e. Methylene Green and hydroquinone in the measurement series performed in the same solution. The influence of native DNA and DNA probe on the electrochemical behaviour of the markers in different measurement condi-

tions as well as the contribution of specific and non-specific interaction of the markers with the components of the surface layer are discussed.

Литература

1. *Hasoň S., Vetter V.* Application of thin film mercury electrodes and solid amalgam electrodes in electrochemical analysis of the nucleic acids components: detection of the two-dimensional phase transients of adenosine // *Bioelectrochemistry.* – 2004. – V. 63. – P. 37–41.
2. *Keusgen M.* Biosensors: new approaches in drug discovery // *Naturwissenschaften.* – 2002. – V. 89. – P. 433–444.
3. *Lee T.M.-H., Hsing I.-M.* DNA-based bioanalytical microsystems for handheld device applications // *Anal. Chim. Acta.* – 2006. – V. 556. – P. 26–37.
4. *Hart J.P., Wring S.A.* Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses // *Trends in Anal. Chem.* – 1997. – V. 16. – P. 89–103.
5. *Yang M., McGovern M.E., Tompson M.* Genosensor technology and the detection of interfacial nucleic acid chemistry // *Anal. Chim. Acta.* – 1997. – V. 346. – P. 259–275.
6. *Zhou X.C., Huang L.Q., Li S.F.Y.* Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystall microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and application in genetic diagnosis // *Biosens. Bioelectron.* – 2001. – V. 16. – P. 85–95.
7. *Mascini M., Palchetti I., Marrazza G.* DNA electrochemical biosensors // *Fresenius J. Anal. Chem.* – 2001. – V. 369. – P. 15–22.
8. *Xu C., Cai H., He P., Fang Y.* Electrochemical detection of sequence-specific DNA using a DNA probe labeled with aminoferrocene and chitosan modified electrode immobilized with ssDNA // *Analyst.* – 2001. – V. 126. – P. 62–65.
9. *Patolsky F., Katz E., Bardea A., Willner I.* Enzyme-linked amplified electrochemical sensing of oligonucleotide-DNA interactions by means of the precipitation of an insoluble product and using impedance spectroscopy // *Langmuir.* – 1999. – V. 15. – P. 3703–3706.
10. *Erdem A., Kerman K., Meric B., Akarka U.S., Ozsoz M.* Novel hybridization indicator methylene blue for the electrochemical detection of short DNA sequences related to hepatitis B virus // *Anal. Chim. Acta.* – 2000. – V. 422. – P. 139–149.
11. *Meric B., Kerman K., Ozkan D., Kara P., Erensoy S., Akarka U.S., Mascini M., Ozsoz M.* Electrochemical DNA biosensor for the detection of TT and Hepatitis B virus from PCR amplified real samples by using methylene blue // *Talanta.* – 2000. – V. 56. – P. 837–846.
12. *Berney H., West J., Alderman J., Lane W., Collins J.K.* A DNA diagnostic biosensor: development, characterization and performance // *Sensors Actuators B.* – 2000. – V. 68. – P. 100–108.
13. *Suprun E.V., Budnikov H.C., Evtugyn G.A., Brainina Kh.Z.* Bi-enzyme sensor based on thick-film carbon electrode modified with electropolymerized tyramine // *Bioelectrochemistry.* – 2004. – V. 63. – P. 281–284.

Поступила в редакцию
24.03.06

Порфирьева Анна Вениаминовна – аспирант кафедры аналитической химии Казанского государственного университета.

Стойкова Екатерина Евгеньевна – кандидат химических наук, старший преподаватель кафедры аналитической химии Казанского государственного университета.

E-mail: *Ekaterina.Stoikova@ksu.ru*

Белякова Светлана Викторовна – кандидат химических наук, младший научный сотрудник кафедры аналитической химии Казанского государственного университета.

Евтюгин Геннадий Артурович – доктор химических наук, профессор кафедры аналитической химии Казанского государственного университета.

E-mail: *Gennady.Evtugyn@ksu.ru*

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

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