

На правах рукописи

Бабкина Софья Сауловна

**БИОАФФИННЫЙ МЕТОД НА ОСНОВЕ ДНК ДЛЯ
ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ, ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С
ЭФФЕКТОРАМИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ
СИСТЕМАХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

02.00.02 - аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук**

Саратов - 2005

На правах рукописи

Бабкина Софья Сауловна

Бабкина

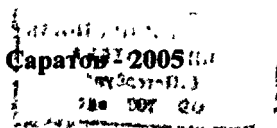
**БИОАФФИННЫЙ МЕТОД НА ОСНОВЕ ДНК ДЛЯ
ИЗУЧЕНИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ, ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С
ЭФФЕКТОРАМИ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ В МНОГОКОМПОНЕНТНЫХ
СИСТЕМАХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

02.00.02 - аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора химических наук



Работа выполнена в Казанском государственном университете

Научный консультант

доктор химических наук, профессор
Будников Герман Константинович

Официальные оппоненты

доктор химических наук, профессор
Кулапина Елена Григорьевна

доктор химических наук, профессор
Дзантиев Борис Борисович

доктор химических наук, профессор
Евгеньев Михаил Иванович

Ведущая организация

Московский государственный
университет им. М.В.Ломоносова

Защита состоится «3» февраля 2005 года в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.243.07 при Саратовском государственном университете им. Н.Г.Чернышевского по адресу: 410012, Саратов, ул. Астраханская, 83, СГУ, корп.1, химический факультет.

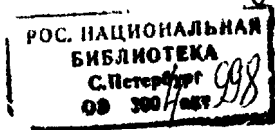
С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Саратовского государственного университета им. Н.Г.Чернышевского.

Автореферат разослан «1» декабря 2004 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор химических наук,
профессор

Федотова

О.В. Федотова



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы.

Острота стоящих перед цивилизацией экологических проблем, потребность в своевременной и высокоспецифичной диагностике генетических и аутоиммунных заболеваний и контроле лечения сильнодействующими препаратами приводят к необходимости разработки новых высокочувствительных, специфичных и экспрессных методов определения биологически активных веществ (БАВ). Решение этой задачи базируется на объединении подходов и достижений биохимии, медицины, аналитической, бионеорганической химии, физико-химических методов анализа. Именно таким мультидисциплинарным подходом является разработка биоаффинных методов (БАМ) анализа, использующих высокую специфичность лиганд-рецепторного связывания, характерную для процессов биохимического распознавания с участием природных рецепторов - нуклеиновых кислот, ферментов, антител (АТ) и т.д. Реализация возможностей БАМ в аналитической химии, в том числе для решения задач исследования механизма действия БАВ, во многом определяется системой распознавания, регистрации и усиления биохимического сигнала.

БАМ с электрохимической и спектрофотометрической регистрацией отличаются простотой аппаратного оформления, достаточно высокой чувствительностью и универсальностью в отношении регистрируемых биохимических процессов, что позволяет использовать их для оценки количественных параметров аффинных взаимодействий (констант комплексообразования, аффинных констант связывания и т.д.) и моделирования в исследовательских и прикладных целях. БАМ с использованием электрохимических биосенсоров (БС) дают возможность исследовать процессы на границе раздела фаз мембрана - водная среда, характерные для биологических систем, и решать задачи моделирования биохимических реакций, оценки фармакокинетики и процессов миграции и биотрансформации экотоксикантов в живых организмах. Не случайно, судя по публикациям в отечественных и международных научных изданиях и по количеству регулярно проводимых симпозиумов, БАМ с электрохимической регистрацией сигнала являются преимущественным направлением исследования в области биохимических методов анализа.. Вместе с тем, потенциальные возможности электрохимических БС реализованы только в связи с определением отдельных субстратов ферментов в биологических жидкостях и ингибиторов холинэстеразы в эколого-аналитическом контроле.

Значительно менее изучены аффинные взаимодействия с участием нуклеиновых кислот, особенно денатурированной односпиральной дезоксирибонуклеиновой кислоты (д-ДНК), хотя ее значение как биоспецифического аналитического реагента трудно переоценить. Благодаря многообразию функциональных групп и взаимодействий, ДНК и д-ДНК могут быть с успехом использованы для изучения взаимодействий и определения низ-

комолекулярных эффекторов, многие из которых относятся к приоритетным экотоксикантам (тяжелые металлы), лекарственным препаратам (противоопухольные средства на основе комплексов металлов и алкалоидов), и высокомолекулярных эффекторов - биомаркеров иммунодефицитных состояний (антитела к ДНК). Уже это перечисление показывает, насколько универсальны возможности БАМ на основе соответствующих БС. При этом следует учитывать, что система эффектор-д-ДНК максимально адекватно моделирует процессы, происходящие в организме под действием денатурирующих агентов. Результаты таких исследований могли бы помочь в предсказании механизма такого воздействия, что, в свою очередь, актуально не только для аналитической химии, но и для фармации (фармакокинетика, направленный индивидуальный выбор противораковых лекарственных препаратов) и экотоксикологии (ускоренное тестирование мутагенной и онкогенной активности загрязнителей, проблемы нормирования их поступления в окружающую среду и последствий техногенных выбросов). ДНК-содержащий БС может стать новым и, возможно, наиболее эффективным средством экологического контроля.

Большое значение для увеличения чувствительности биохимического анализа имеет дальнейшее развитие новых эффективных способов усиления сигнала биоаффинного взаимодействия, основанных на использовании ферментативных реакций и каталитических электрохимических процессов.

Для повышения экспрессности биоанализа и проведения массовых анализов актуальна разработка простых высокопроизводительных тест-систем на основе изучения биоаффинных взаимодействий на твердых поверхностях, которое само по себе представляет фундаментальный интерес для развития биосенсорной технологии.

В настоящее время интенсивное развитие получило новое научное направление по созданию ДНК-зондов. В рамках данного научного направления актуальна разработка новых электрохимических БС на основе биоаффинного распознавания комплементарных оснований ДНК и создание соответствующих БАМ для определения повреждений структуры молекулы ДНК, диагностики генетических заболеваний, решения задач судебной медицины и обнаружения патогенных микроорганизмов.

Хотя значение указанных задач и потенциальной сферы применения молекул ДНК как биоаффинных элементов распознавания очевидно, исследования в данной области не носят системного характера и не отвечают потребностям современной науки. Применение ДНК в составе БС носит фрагментарный характер и не позволяет в полной мере сформулировать закономерности, определяющие аналитические характеристики разрабатываемых БАМ, выявить факторы, влияющие на селективность и чувствительность определения низко- и высокомолекулярных соединений, и найти способы управления ими для решения конкретных аналитических, медицинских и экотоксикологических задач.

Целью настоящего исследования является развитие фундамен-

тальных и прикладных основ биоаффинного метода анализа с использованием нового биоспецифического аналитического реагента - ДНК в денатурированной односпиральной и нативной формах, развитие подходов к оценке количественных параметров биоаффинного взаимодействия между биологически активным веществом и его эффектором и создание на этой основе амперометрических биосенсоров и тест-систем со спектрофотометрической и визуальной регистрацией аналитического сигнала для высокочувствительного, специфического и экспрессного определения низко- и высокомолекулярных биологически активных веществ в многокомпонентных системах.

Для достижения данной цели были поставлены и успешно решены следующие задачи:

- изучение комплексообразования ионов тяжелых металлов с различными формами ДНК, установление состава комплексов и констант их устойчивости; обоснование выбора формы ДНК по критериям эффективности аффинного взаимодействия для последующей разработки БАМ;

- обоснование выбора носителя биолиганда и рабочих условий формирования биоспецифической поверхности, обеспечивающих наилучшие характеристики БАМ на основе биосенсоров и тест-систем для экспрессного контроля аффинных взаимодействий с визуальной и спектрофотометрической регистрацией сигнала;

- разработка различных аффинных ДНК-содержащих БС с амперометрической регистрацией сигнала и БАМ на их основе; изучение специфической адсорбции и использование биоспецифического мембранного концентрирования БАВ на БС, определение их операционных и аналитических характеристик и констант аффинного связывания низкомолекулярных соединений (тяжелых металлов, противоопухолевых препаратов на основе комплексов платины и интеркалятора ДНК аймалина);

- разработка новых путей повышения избирательности определения низкомолекулярных БАВ, основанных на направленной их модификации для повышения сродства к биолиганду, и увеличения чувствительности анализа за счет использования ферментативных и иммунохимических биоаффинных взаимодействий;

- разработка ДНК-содержащих иммуно- и иммуноферментных сенсоров (ИФС), ДНК-зондов и тест-систем с усилением сигнала за счет каталитических процессов для высокочувствительного и специфического определения высокомолекулярных БАВ (антител, полинуклеотидов), количественной оценки специфичности их взаимодействия и диагностики заболеваний.

- оптимизация условий практического использования разработанных БАМ определения БАВ в сыворотке крови, в природных и пищевых объектах при экомониторинге; изучение влияния компонентов анализируемой системы на регистрируемый сигнал и результаты определения.

Научная новизна:

- сформулированы научные и методические подходы к разработке и

применению биоаффинного метода анализа низко- и высокомолекулярных БАВ на основе амперометрических БС и тест-систем со спектрофотометрической и визуальной регистрацией аналитического сигнала;

- предложены новые подходы к оценке количественных параметров биоаффинного взаимодействия, основанные на комплексном изучении механизма, термодинамики, кинетики данного взаимодействия, а также сорбционных процессов на биоспецифических модифицированных нитроцеллюлозных мембранах;

- количественно обосновано использование д- ДНК, иммобилизованной в составе нитроцеллюлозной мембраны, для биоспецифического мембранного концентрирования в биоаффинных методах анализа БАВ, в том числе при совместном присутствии, с электрохимической, спектрофотометрической и визуальной регистрацией аналитического сигнала;

- предложены принципы создания систем распознавания биоаффинного взаимодействия, учитывающих природу участвующих в нем компонентов, с использованием ферментов, их субстратов и эффекторов, комплексов тяжелых металлов. Показана эффективность использования стерического экранирования одного из компонентов системы распознавания в случае биоаффинного взаимодействия ДНК с аутоантителами;

- предложены и оптимизированы условия применения систем каталитического усиления сигнала биоаффинного взаимодействия и систем его детектирования на основе разработанных амперометрических БС, использующих новые способы иммобилизации биомолекул;

- разработан алгоритм создания и использования ДНК-содержащих биосенсоров, позволяющий целенаправленно получать системы с наилучшими операционными характеристиками для решения широкого круга сложных аналитических задач;

- предложено и на конкретных примерах продемонстрировано использование ДНК как универсального элемента биохимического распознавания и как универсального биоспецифического аналитического реагента, а амперометрических БС и тест-систем на ее основе как новых современных аналитических инструментов для биохимического, медицинского, ветеринарного и экологического анализа многокомпонентных систем;

- впервые с помощью амперометрического ДНК-содержащего БС установлена гетерогенность состава аутоантител (аутоАТ) по специфичности к д-ДНК; установленные значения констант связывания ДНК-аутоАТ доказывают высокую специфичность аутоАТ к д-ДНК, что позволяет использовать их в качестве маркеров при диагностике аутоиммунных заболеваний;

- на основе изучения влияния природы носителя биомолекул, влияния сопутствующих элементов в многокомпонентных биологических и экологических объектах на аналитический сигнал впервые разработаны универсальные БАМ высокочувствительного, селективного и экспрессного определения лекарственных препаратов (аймалин, цисплатин, оксоплатин), ионов тяжелых металлов (**Cu(II)**, **Pb(II)**, **Cd(II)**, **Fe(III)**), антител к ДНК и

специально синтезированных антител к аймалину и для определения ДНК и нуклеотидных последовательностей.

Практическая значимость.

Выявлены и обоснованы новые области применения разработанных БАМ на основе БС и тест-систем с электрохимической, спектрофотометрической и визуальной регистрацией аналитического сигнала в биохимическом анализе в медицине и ветеринарии, в анализе объектов системы санитарно-эпидемиологического контроля и в экоаналитическом мониторинге объектов окружающей среды. Все методики просты, относительно дешевы, требуют очень малый объем образцов.

Предложены высокочувствительные, селективные и экспрессные методики, не требующие пробоподготовки, для определения тяжелых металлов (Pb, Cd, Fe и Си) на основе их взаимодействий с ДНК в составе разработанного аффинного амперометрического ДНК-содержащего БС в сыворотке крови человека при интоксикации. Определение Fe и Си в сыворотке крови человека с помощью данного ДНК-содержащего БС использовано для диагностики анемии и определения ее типа. Результаты, полученные с помощью разработанных методик, согласуются с данными стандартных методов анализа, используемых в клинических лабораториях отделений токсикологии больницы №6 и №12 г. Казани.

С помощью разработанного БАМ на основе амперометрического ДНК-содержащего БС для анализа тяжелых металлов и оптимизированных методик их определения в пищевых объектах и объектах окружающей среды осуществлен аналитический контроль содержания данных металлов в образцах, предоставленных Санитарно-эпидемиологической станцией г. Казани. Правильность предложенных методик анализа установлена независимыми спектральными и электрохимическими методами. Использование этих методик позволяет определять токсиканты на уровне ПДК и меньших концентраций и судить об их потенциальной мутагенной и канцерогенной активности, при этом сам амперометрический ДНК-содержащий БС является новым эффективным средством экологического контроля.

С использованием амперометрических ДНК-содержащих БС разработаны высокочувствительные, экспрессные и селективные методики определения противоопухолевых лекарственных препаратов на основе комплексов платины (цисплатина и оксоплатина) и алкалоидов (аймалина) в лекарственных формах при контроле качества в процессе фармпроизводства и в сыворотке крови пациентов Республиканского онкологического диспансера (г. Казань) в процессе терапевтического мониторинга.

Предложен новый способ получения конъюгата индольного алкалоида аймалина с бычьим сывороточным альбумином (БСА), иммунизация которым позволила получать высокоспецифичные АТ к аймалину в высокой концентрации и с устойчивой иммунологической активностью. Разработаны высокоселективные и чувствительные спектрофотометрические методики иммуноферментного определения антител к аймалину и аймали-

на, и экспрессная тест-система определения алкалоида, которые могут быть использованы как на стадии выделения из растительного материала, так и при лекарственном мониторинге данного антиаритмического кардиопрепарата. Методики были апробированы в лаборатории иммунохимии кафедры биохимии Казанского государственного университета и в НПК «Биохим» Казанского гос.университета.

Разработаны высокочувствительные, высокоселективные и значительно более экспрессные по сравнению с традиционным спектрофотометрическим иммуноферментным анализом (ИФА) на полистирольных планшетах варианты БАМ на основе ДНК и твердофазного иммуноанализа с электрохимической регистрацией сигнала, без разделения иммунокомпонентов, для определения аутоАТ к ДНК с использованием: (1) - ингибиторного медиаторного ИФА; (2) - иммуноферментного сенсора на основе ДНК и холинэстеразы (ХЭ); и (3) - ДНК-содержащего БС и комплекса платины. Данные методы использованы для количественного контроля содержания аутоАТ в сыворотке крови норок и для диагностики вирусного заболевания - алеутской болезни норок (АБН) и апробированы в лаборатории иммунохимии кафедры биохимии Казанского государственного университета.

Для проведения массовой диагностики аутоиммунных заболеваний разработана простая, экономичная, экспрессная биоаффинная тест-система твердофазного ИФА на основе ДНК-содержащих нитроцеллюлозных (НЦ) мембран для определения аутоАТ со спектрофотометрической регистрацией аналитического сигнала. Для качественной характеристики результатов диагностики разработана система ее визуальной оценки. НЦ мембраны после проведения диагностики могут храниться длительное время как документальные материалы тестирования. На основе тест-системы созданы иммуноферментные наборы для экспресс-диагностики АБН на модифицированной НЦ мембране в ветеринарии в условиях зверосовхозов. Методика диагностики АБН на основе тест-системы апробирована и внедрена в зверосовхозах «Бирюлинский», «Раифский», «Тойминский» (Республика Татарстан) и в зверосовхозе «Гамовский» (Приморский край), а иммуноферментные диагностикумы на основе разработанной тест-системы были представлены на международной выставке биопрепаратов (г.Казань, ГИДУВ, 1992 г.).

Новый аффинный амперометрический ДНК-зонд на основе олигонуклеотидов использован для высокоспецифичного и чувствительного определения ДНК и последовательности ее нуклеотидов и апробирован в Лаборатории биофизической химии и молекулярной онкологии Института биофизики АН Чешской Республики (г.Брно).

Состав биосенсорной части иммуноферментного сенсора, его использование в иммунодиагностике и способ медиаторного определения антител в сыворотке крови защищены авторскими свидетельствами. Способ получения конъюгата аймалина с БСА, получение на его основе АТ к аймалину и их определение защищены патентом РФ.

Теоретические и практические результаты диссертации используются при чтении курсов «Основы бионеорганической химии», «Химия в экологии» и «Техногенные системы и экологический риск» на химическом факультете Казанского гос.университета и нашли отражение в учебно-методической литературе.

На основании проведенных исследований разработаны теоретические, практические положения и выводы, совокупность которых можно квалифицировать как новое крупное научное достижение в области биохимических методов анализа, а именно развитие теоретических и практических подходов к созданию новых высокочувствительных и специфических биоаффинных методов анализа на основе ДНК как универсального элемента биохимического распознавания и аналитического биоспецифического реагента для определения и изучения биологически активных веществ с использованием биосенсоров и тест-систем.

На защиту выносятся:

- результаты исследования комплексообразования различных форм молекулы ДНК с ионами тяжелых металлов, найденные величины констант устойчивости и констант связывания; обоснование выбора денатурированной ДНК как биоспецифического аналитического реагента;

- новые способы ковалентной иммобилизации ДНК и ее фрагментов на нитроцеллюлозных мембранах и результаты разработки новых аффинных амперометрических ДНК-содержащих биосенсоров;

- результаты изучения специфической адсорбции тяжелых металлов на ДНК-содержащей мембране аффинного биосенсора как из индивидуальных растворов, так и при совместном присутствии металлов в растворе; результаты оценки относительной способности тяжелых металлов связываться с иммобилизованными молекулами денатурированной ДНК;

- результаты разработки БАМ на основе амперометрических биосенсоров и тест-систем со спектрофотометрической и визуальной регистрацией аналитического сигнала для определения низко- и высокомолекулярных биологически активных веществ, в том числе с использованием ДНК в качестве биоспецифического аналитического реагента;

- данные о возможности использования принципа стерического исключения компонента биореакции для распознавания биоспецифического взаимодействия, а также каталитических ферментативных реакций с участием различных ферментов, их субстратов и ингибиторов, и каталитических токов выделения водорода для усиления сигналов, полученных в результате биоаффинного взаимодействия;

- влияние различных факторов на эффективность биоаффинного распознавания при проведении анализа (природа матричных компонентов, время предварительного биоаффинного мембранного концентрирования, рН); подбор оптимальных условий для увеличения селективности, экспрессности, снижения предела обнаружения и способы реактивации биоаффинных систем для их многократного использования в анализе;

- способ получения иммуногенного комплекса аймалин-белковый носитель для получения антител к низкомолекулярному гаптену - аймалину; результаты изучения специфичности взаимодействия аймалина с антителами и ДНК с аутоантителами;

- новые аналитические методики биоаффинного электрохимического и спектрофотометрического определения с помощью биосенсоров и тест-систем низкомолекулярных биологически активных веществ (тяжелых металлов, комплексов **Pt(II)** и **Pt(IV)**, аймалина) и высокомолекулярных биологически активных веществ (ДНК, олигонуклеотидов, антител к аймалину, аутоантител к ДНК) в модельных системах, сыворотке крови, пищевых объектах и объектах окружающей среды.

Диссертационная работа проводилась в рамках программы Министерства образования РФ по следующим направлениям: «Теоретические и экспериментальные исследования сложных реакционных систем на основе координационных соединений» № гос.регистрации 01910050241; «Координационные соединения 3d переходных платиновых и редкоземельных металлов: термодинамика и кинетика образования в различных средах, синтез, строение, свойства, направления практического использования» № гос.регистрации 01960002010 и при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 94-03-09265а, 94-03-09263а, 97-03-33232а, 00-03-32389а, 03-03-33116), конкурсного центра «Университеты России» (1993-1996), гранта ES INCO Copernicus NERBIC 15СТ-98-0910 (1998-2001), Агентства по грантам Чешской Республики (грант No 203/02/0422) и Агентства по грантам Академии Наук Чешской Республики (грант No A1163201).

Апробация работы.

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на VI Всесоюзной конференции по аналитической химии органических веществ (Москва, 1991), Всесоюзной конференции "Аналитическая химия объектов окружающей среды"(С-Петербург, 1991), Всесоюзной конференции "Современные методы контроля качества окружающей среды и пищевых продуктов" (Краснодар, 1991), 4th, 5th, 6th, 7th, 8th, 9th European Conference on Electroanalysis (ESEAC'92,94,96,98,2000,2002) (Нордвикерхаут, Нидерланды, 1992, Венеция, Италия, 1994, Дарем, Великобритания, 1996, Коимбра, Португалия, 1998, Бонн, Германия, 2000, Краков, Польша, 2002), International Symposium "Sensor-Techno" (С.Петербург, 1993), XV, XVI, XVII Менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Минск, 1993, Москва, 1998, Казань, 2003), International Symposium on Electroanalysis in Biochemical, Environmental and Industrial Sciences (Лохборо, Великобритания, 1993), . European Conference "Euroanalysis VIII", "Euroanalysis IX" (Эдинбург, Великобритания, 1993, Болонья, Италия, 1996), IV, V конференции «Электрохимические методы анализа» (ЭМА-94), (ЭМА-99) (Москва, 1994, 1999), симпозиуме "Проточный анализ" (Москва, 1994), Symposium on Electroanalysis Tribute to Thomas (Кардифф, Великобритания, 1994), International Conference "Analytical quality control and reference materials"

(Рим, Италия, 1994), 13th International Conference on Phosphorus Chemistry (Иерусалим, Израиль, 1995), Symposium on Ecological Chemistry (Кишинев, Молдова, 1995), Asianalysis III (Сеул, Корея, 1995), 5th International Symposium on Kinetics in Analytical Chemistry. "КАС'95". (Москва, 1995), 24th International IUPAC Conference on Solution Chemistry (Лиссабон, Португалия, 1995), II, III, IV, V Всоссийской конференции по анализу объектов окружающей среды "Экоаналитика - 96", "Экоаналитика - 98", "Экоаналитика - 2000", "Экоаналитика - 2003" (Краснодар, 1996, 1998, 2000, С.Петербург, 2003), XVI Международном Черняевском совещании (Екатеринбург, 1996), Academy of New York Conference "B Lymphocytes and Autoimmunity" (Прага, Чехия, 1996), 10th European Conference on Solid-State Transducers (Лювен, Бельгия, 1996), Gordon Research Conference on Biosensors (Вентура, США, 1996), International Congress on Analytical Chemistry (Москва, 1997), Giulio Milazzo School on Bioelectrochemistry (Сегед, Венгрия, 1997), Eurosensors XI, Eurosensors XII (Варшава, Польша, 1997, Саутгемптон, Великобритания, 1998), 8th European Congress On Biotechnology (Будапешт, Венгрия, 1997), VII International Conference on the Problems of Solvation and Complex Formation in Solutions (Иваново, 1998), 9th International Conference on Modern Materials and Technologies, СИМТЕС'98 (Флоренция, Италия, 1998), Поволжской региональной конференции. Физико-химические методы в координационной и аналитической химии (Казань, 1999), International Conference «Modern Electroanalytical Methods» (Пардубице, Чехия, 1999), 8th, 9th International Meeting on Chemical Sensors (Базель, Швейцария, 2000, Бостон, США, 2002), Международной конференции. Сенсор-2000. Сенсоры и микросистемы. (С.Петербург, 2000), Региональной научной конференции «Методы аналитического контроля материалов и объектов окружающей среды» (Пермь, 2001), Поволжской конференции по аналитической химии (Казань, 2001), Всероссийской конференции «Актуальные проблемы аналит.химии» (Москва, 2002), Междисциплинарной конференции с международным участием «Новые биокрибернетические и телемедицинские технологии 21-го века для диагностики и лечения заболеваний человека» НБИТТ-21 (Петрозаводск, 2002), 2я Российской научной конференции «Проблемы теоретической и экспериментальной аналитической химии» (Пермь, 2002), 7th World Congress on Biosensors (Киото, Япония, 2002), XXI Международной Чугаевской конференции по координационной химии (Киев, 2003), Международном форуме «Аналитика и аналитики» (Воронеж, 2003), XVII International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics (Флоренция, Италия, 2003), открытом научном семинаре Утрехтского университета (Нидерланды, 1992), научном семинаре Лаборатории биофизической химии и молекулярной онкологии Института биофизики АН Чешской Республики (Брно, Чехия, 2003), VI Всероссийской конференции по электрохимическим методам анализа «ЭМА-2004» (Уфа, 2004), Всероссийской конференции по аналитической химии «Аналитика России-2004» (Москва, 2004).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 106 работ, из них 3 авторских свидетельства об изобретении, 1 патент на изобретение РФ, 1 обзор, 16 статей в центральных Российских журналах, 6 статей в международных научных изданиях, 4 учебно-методических пособия.

Личный вклад автора заключается в теоретическом обосновании проблемы, постановке и решении основных задач исследования, обработке и интерпретации экспериментальных результатов. В диссертации изложены результаты исследований, выполненных автором лично, а также дипломниками и аспирантами, работавшими под руководством и со руководством автора. Личный вклад автора в работы, выполненные в соавторстве и включенные в диссертацию, состоит в разработке подходов к изучению функционирования и оценке количественных параметров взаимодействия биологически активных веществ, к разработке биоаффинных методов анализа на основе биосенсоров и тест-систем, в обосновании основных направлений их практического применения, а также систематизации, обобщении и анализе полученных результатов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 305 страницах машинописного текста, состоит из списка сокращений, общей характеристики работы, 7 глав, заключения, выводов, списка литературы (302 наименования) и приложения. В работе содержатся 37 таблиц и 29 рисунков. В приложении представлены документы о внедрении и регистрации авторских прав (авторские свидетельства и патент) на разработки, выполненные по теме диссертации.

Автор выражает глубокую благодарность заведующему кафедрой неорганической химии Казанского университета профессору Н.А.Улаховичу, заведующему кафедрой аналитической химии профессору Г.К.Будникову, профессорам Э.П.Медянцевой, Ю.И.Сальникову, Г.А.Евтюгину и доценту В.Г.Штырлину за постоянную поддержку, полезные советы и замечания, высказанные в процессе обсуждения работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Литературный обзор посвящен анализу и систематизации литературных данных о взаимодействии ДНК с низко- и высокомолекулярными БАВ и электрохимическим БАМ их определения с использованием ДНК. Взаимодействие ДНК с ионами тяжелых металлов и их комплексами протекает, в основном, с участием азотистых гетероциклов ДНК (пуриновых и пиримидиновых оснований). Это взаимодействие оказывает существенное влияние на функционирование ДНК в биологических системах, поскольку останавливает или замедляет деление клеток. Такое воздействие комплексов платины используется при лечении онкологических заболеваний. Изучение взаимодействия ДНК с антителами необходимо для диагностики аутоиммунных заболеваний. Для определения эффекторов ДНК перспективными оказались электрохимические ДНК-сенсоры. В обзоре выделены и подробно рассмотрены основные области их аналитического применения:

определение экотоксикантов; определение лекарственных средств в биологических объектах; определение белков и антител при диагностике заболеваний; определение нуклеотидной последовательности молекул ДНК с помощью ДНК-сенсоров, действие которых основано на процессе гибридизации (ДНК-зондов); определение повреждений молекул ДНК. Анализ литературных данных показывает перспективность оценки количественных параметров биоаффинных взаимодействий ДНК с эффекторами для последующей разработки на этой основе более чувствительных, высокоспецифичных и экспрессных биоаффинных методов анализа биологически активных веществ.

1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью решения поставленных задач использовались следующие *методы исследования*: различные виды вольтамперометрии с использованием ППТ-1, ПУ-1, осциллографического полярографа ЦЛА ПО-5122, модель 03 (СССР), вольтамперометрической системы SVA-1BM-01 «Аналитик», Болгария; потенциостата ПИ-50-1.1; потенциостата AUTOLAB «EcoChemie», Нидерланды, соединенного с VA-Stand 663 «Metrohm», Швейцария. Использовалась также спектрофотометрия, атомно-абсорбционная спектрометрия (с использованием спектрофотометра СФ-46, Lambda EZ 210 и спектрофотометра Z-6100 и U-2000 «Hitachi», Япония; оптического денситометра Multiscan «Flow»; двулучевого хроматосканнера CS-930 «Shimadzu», Япония), иммуноэлектросмофорез, тонкослойная хроматография.

В работе изучены следующие *объекты*: нативная ДНК (н-ДНК), д-ДНК, их комплексы с ионами металлов (**M**) **Pb(II)**, **Cd(II)**, **Cu(II)**, **Fe(III)**; цис-дихлородиамминплатина(**II**) (цисплатин) **цис-[Pt(NH₃)₂Cl₂]**, цис-дихлородиаммин-транс-дигидроксоплатина (**IV**) (оксоплатин) **[Pt(NH₃)₂Cl₂(OH)₂]**; алкалоид аймалин (**C₂₀H₂₆N₂O₂**); иммуноглобулин G (IgG) сыворотки крови норки, инфицированных АБН; IgG сыворотки крови крыс и кроликов, иммунизированных комплексом аймалин-БСА; стрептавидин, меченный щелочной фосфатазой (ЩФ); пероксидаза хрена (ПХ) и ее субстрат H₂O₂ в присутствии о-фенилендиамина (ОФД), 3,3'-диаминобензидина (ДАБ); холинэстераза (ХЭ), ее субстрат бутирилтиохоллин иодид (БТХИ) и ее ингибиторы бис(оксиметил)фосфиновая кислота (**БОФК**) **(HOH₂C)₂P(O)OH** и **О,О-диметил(2,2,2-трихлор-1-оксизтил)фосфонат (хлорофос) (CH₃O)₂P(O)CH(OH)CCl₃**; ЩФ и ее субстрат 1-нафтилфосфат C₁₀H₇PO₄; олигодезоксинуклеотиды (ОДН): 24ТТС, n(GAATTC)₃, CAGGCACAAACACGCACSTC(A)₂₀, 5'TTGG(TTTTTTCTC)4TTTTTG (A)_{253'} и олигодезоксинуклеотиды, меченные биотином; 12 GAA-биотин, 12 TTC-биотин, WT273-биотин и GAGGTGCGTGTGTGTCCTG-3'-биотин.

Получение биосенсорной части аффинных БС. Для получения биосенсорной части *ДНК-содержащего БС* навеску НЦ со средним содер-

жанием азота 11,5 - 12% растворяли в смеси ацетона и толуола, добавляли раствор *n*-ДНК либо *d*-ДНК, раствор глутарового альдегида и гексан в качестве коагулянта. Из этой смеси на стеклянной поверхности получали пленку. При работе с антителами (АТ) мембрану с иммобилизованной денатурированной ДНК (д-ИДНК) перед использованием помещали в раствор БСА для блокирования свободных функциональных групп глутарового альдегида и предотвращения неспецифического связывания. Пленку закрепляли на поверхности стационарного ртутно-пленочного электрода (СРПЭ) или стеклоуглеродного электрода (СЭ).

Для получения биосенсорной части ДНК-зондов навеску НЦ растворяли в смеси ацетона и толуола, приливали раствор ОДН, перемешивали, добавляли глутаровый альдегид, гексан и перемешивали. Полученную смесь наносили на рабочую поверхность СЭ.

Для получения биосенсорной части ФС и ИФС навеску НЦ растворяли в смеси толуола и бутилацетата, добавляли раствор ХЭ или раствор д-ДНК, содержащий ХЭ, соответственно, затем добавляли раствор глутарового альдегида и гексан. Полученную пленку обрабатывали раствором БСА и закрепляли на поверхности СРПЭ.

Обработка данных по комплексообразованию металл - ДНК. Для установления состава комплексов металлов с д-ИДНК и их констант устойчивости определяли равновесную концентрацию ионов металла в процессе их комплексообразования при постоянной концентрации лиганда ДНК (L) спектрофотометрически по поглощению роданида **Fe(II)** при 479 нм и комплексоната **Cu(II)** при 276 нм, вольтамперометрически по величине I_p при -0,2 В и -0,4 В для комплексоната **Fe(III)** и **Cu(II)**, соответственно, и по градуировочным графикам. Обработка результатов проводилась с использованием программы CPESP (Э.С.Щербаклова и др. Изв.АН СССР. Сер.хим. 1975. №6; Shevelkova A.N., Salnikov Yu.I. et al. FEBS Lett. 1996. V.383).

Построение изотерм адсорбции ионов тяжелых металлов с помощью амперометрического ДНК-содержащего БС. Для построения изотерм адсорбции количество молей ионов тяжелых металлов, связавшихся с молекулами д-ИДНК в составе БС, определяли вольтамперометрически по токам восстановления ионов **Pb(II)** или **Cd(II)** при -0,4В и -0,65В, соответственно, а ионов **Cu(II)** и **Fe(III)** по токам восстановления их комплексонатов при потенциалах - 0,4 В или - 0,2 В, соответственно. БС погружали на 15 мин в исходный раствор ионов металла, обновляя каждый раз биочувствительную часть сенсора.

2. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ДНК С НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ЭФФЕКТОРАМИ - ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ. ИЗУЧЕНИЕ ИХ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ДНК И БИОАФФИННОЙ СОРБЦИИ НА ДНК-СОДЕРЖАЩЕЙ МЕМБРАНЕ

Комплексообразование тяжелых металлов с различными формами ДНК проводилось на примере ионов Fe(II) и Cu(II), с учетом их высокого сродства к ДНК и необходимостью контроля за их содержанием в сыворотке крови. Обнаруженное в растворах различных форм ДНК увеличение интенсивности поглощения при 258 нм, либо уширение полосы поглощения в присутствии ионов Fe(III) и Cu(II) свидетельствуют о связывании данных ионов с молекулами ДНК, сопровождающемся нарушением структуры ДНК за счет разрыва водородных связей между азотистыми основаниями, либо за счет образования с ними координационных связей. Последний процесс четко выражен именно для термически денатурированной ДНК.

Некоторые результаты определения констант устойчивости (ρ) полученных комплексов различного состава и долей их накопления (α) по спектрофотометрическим и вольтамперометрическим данным для растворов ДНК или д-ДНК при pH 2,5 в зависимости от концентрации ионов М, представлены в Табл.1 и на рис.1 (кривые 2,3). Обработка полученных данных выполнена методом математического моделирования (см. раздел 1), ошибка экспериментально полученных результатов не превышает 9%. Из полученных данных следует, что при одних и тех же условиях комплексообразование ионов М с д-ДНК происходит эффективнее, чем с ДНК: на один нуклеотид приходится больше ионов М, больше и доля накопления комплекса в растворе.

Проведенные исследования процесса комплексообразования Fe(III)-ДНК и Си(II)-ДНК являются основанием для выбора д-ДНК для иммобилизации в составе НЦ мембраны амперометрического БС.

Для оценки параметров комплексообразования ионов М с д-ИДНК (получение см. раздел 1) спектрофотометрическим и вольтамперометрическим методом были определены равновесные концентрации ионов М после проведения реакции комплексообразования при pH 2,5. Некоторые результаты представлены в Табл.1 и на рис.1 (кривая 1). Для доказательства отсутствия неспецифической сорбции ионов металла на матрице-носителе в раствор с ионами М опускали НЦ мембрану, не содержащую д-ИДНК, аналитический сигнал при этом не изменялся. Из данных табл.1 и рис.1 видно, что комплексообразование М с д-ИДНК наиболее эффективно в сравнении с другими формами ДНК.

Таким образом, разработана методика изучения комплексообразования металлов с таким сложным многофункциональным биолигандом, как неиммобилизованная и иммобилизованная ДНК, которая позволяет учесть состав и влияние среды, определить реальный состав образующихся комплексов и их устойчивость.

Результаты, полученные с помощью данной методики, свидетельствуют о том, что форма д-ИДНК оптимальна для изучения взаимодействия М и других эффекторов с ДНК и для использования в анализирующих устройствах. Это связано, по-видимому, с отсутствием межнитевых водородных связей и раскрученной и фиксированной на матрице структурой д-

ДНК с доступными центрами связывания.

Таблица 1.

Результаты изучения комплексобразования ионов
Fe(III) и Cu(II) с различными формами ДНК

Форма ДНК	ДНК, рН 2,5	д-ДНК, рН 2,5		д-ИДНК, рН 2,5	
	[FeL*]	[Fe ₂ L]	[Cu ₂ L] и [CuL]	[Fe ₉ L ₄]	[Cu ₁₀ L ₄]
Соотношение нуклеотид : Fe(III)	1 : 1	1 : 2	1 : 2 и 1 : 1	1 : 2,25	1 : 2,5
Lgβ	16.31 ± 0,07	11.33 ± 0,07	14.3 ± 0,1 10.1 ± 0,4	59.78 ± 0,09	61.03 ± 0,02
Доля комплекса при c _{Fe(III)} = 2,19 × 10 ⁻³ моль/л	1,00	0,93	0,62 и 0,8	1,00	0,92
Доля комплекса при c _{Fe(III)} = 7,08 × 10 ⁻³ моль/л	0,42	0,84	0,8 и 0,68	0,96	0,98

*L - один нуклеотид

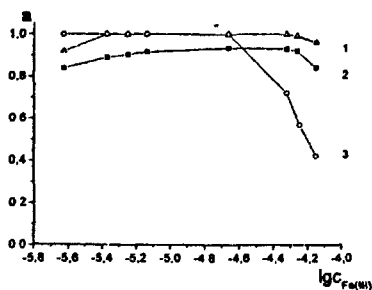


Рис. 1. Доли комплексов Fe(III)-ДНК в системах:

(1) Fe(III)-д-ИДНК, рН 2,5;

(2) Fe(III)-д-ДНК, рН 2,5;

(3) Fe(III)-ДНК, рН 2,5.

С_{ДНК} = 0,01 мг мл⁻¹

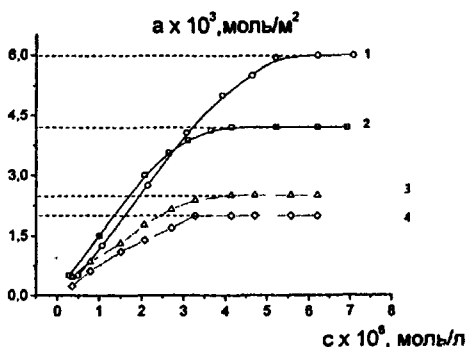


Рис. 2. Изотермы адсорбции ионов тяжелых металлов на д-ИДНК содержащей НЦ мемbrane амперометрического БС: (1) - Pb(II); (2) Cd(II); (3), (4) при совместной адсорбции Pb(II) (3) и Cd(II) (4) из смеси в соотношении 1:1

Биоаффинная сорбция тяжелых металлов на ДНК-содержащей мембране. Биоаффинная сорбция была изучена для установления возможности использования НЦ мембраны с д-ИДНК в качестве биочувствительной части нового аффинного амперометрического БС предназначенного

для определения эффекторов, в том числе тяжелых металлов, в биологических объектах и объектах эколого-аналитического контроля. В исследуемой системе происходит химическая адсорбция ионов тяжелых металлов на биочувствительной части сенсора за счет комплексообразования с д-ИДНК, что позволяет получить более точные и воспроизводимые характеристики процесса адсорбции. Ионы **Pb(II)**, **Cd(II)**, **Cu(II)** и **Fe(III)** выбраны в качестве модельных, как обладающими большим сродством к молекулам ДНК опасные экотоксиканты,. Для контроля специфичности адсорбции проводили холостой опыт.

При построении изотерм адсорбции Ленгмюра (см. раздел 1) концентрацию исходного раствора ионов М увеличивали до выхода изотерм на предел (α_{∞}), обусловленный сорбционной емкостью мембраны (пример на рис.2). Полученные данные α_{∞} (см. рис.2, кривые 1,2, табл.2) указывают на большее сродство ионов Pb(II) к д-ИДНК, чем Cd(II), что соответствует данным о наличии у свинца большего числа вариантов связывания с цепью ДНК. Построены также изотермы адсорбции ионов Pb(II) и Cd(II) из раствора, в котором данные ионы присутствовали совместно в соотношении 1:1, за счет достаточной разницы потенциалов восстановления этих ионов (ΔE 250 мВ) (см. рис.2 кривые 3, 4). Из рис.2 следует, что на мембрану с д-ИДНК сорбируется практически одновременно оба вида ионов, что делает возможным их определение при совместном присутствии с помощью д-ИДНК-содержащего БС.

Таблица 2
Значения α_{∞} тяжелых М на д-ИДНК содержащем БС и $K_{связ}$ М-д-ИДНК

Металл	$\alpha_{\infty} 10^{-3}$, моль/м ²	$K_{связ} 10^5$, л/моль
Cu(II)	8,7	19,1 ± 0,1
Pb(II)	6,0	12,0 ± 0,3
Fe(III)	5,1	1,4 ± 0,3
Cd(II)	4,2	0,6 ± 0,2

Для адсорбции ионов Cu(II) и Fe(III) на биоаффинной поверхности БС значения α_{∞} приведены в табл.2. В условиях конкурентной адсорбции также сорбируется практически одновременно оба вида ионов (значения α_{∞} составляют $5,5 \times 10^{-3}$ моль/м² и $2,3 \times 10^{-3}$ моль/м², для ионов Cu(II) и Fe(III), соответственно), и сохраняется большая сорбционная способность у ионов Cu(II). На основании кинетических кривых адсорбции выбрано минимальное время биоаффинного мембранного концентрирования тяжелых металлов на БС - 15 мин, обеспечивающее экспрессность анализа.

Значения констант связывания ($K_{связ}$) ионов тяжелых металлов с д-ИДНК рассчитаны по модели Скетчарда, основанной на исследовании зависимости отношения концентрации образующегося комплекса М-ДНК к равновесной концентрации М от концентрации образующегося комплекса. По тангенсу угла наклона полученных прямолинейных зависимостей

были найдены значения $K_{\text{связ}}$ комплексов М с д-ИДНК, значения которых для $n=5$, $R=0,95$ приведены в табл.2.

На основании всех проведенных исследований по способности связывания с д-ИДНК выбранные тяжелые металлы можно расположить в следующий ряд: $\text{Cu(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Fe(III)} > \text{Cd(II)}$, который отличается от последовательности для н-ДНК, по-видимому, за счет наличия дополнительных вариантов комплексообразования: образования внутринитинового хелата между N(7) и O(6) атомами гуанина д-ИДНК; образования внутринитиновых сшивок с N(7) атомами гуанина д-ИДНК. Полученные данные еще раз свидетельствуют о преимуществе использования иммобилизованной д-ДНК в различных анализирующих устройствах. Установленное высокое сродство тяжелых металлов к ДНК свидетельствует о перспективности их определения с помощью ДНК-содержащего БС.

3. РАЗРАБОТКА БИОАФФИННЫХ МЕТОДОВ НА ОСНОВЕ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ ДНК-СОДЕРЖАЩИХ БС ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЭФФЕКТОРОВ ДНК

Разработка способа иммобилизации ДНК. В качестве материала матрицы-носителя молекул ДНК и ее фрагментов - ОДН был выбран НЦ, как обладающий гидрофильностью и минимальной неспецифической сорбцией. Для изготовления амперометрического ДНК-содержащего БС предложен новый способ ковалентной иммобилизации н- и д-ДНК: включение молекул ДНК или ее фрагментов (в случае ДНК-зондов) в полимерную матрицу из НЦ с одновременной обработкой глutarовым альдегидом в качестве бифункционального реагента. Подобраны смеси растворителей, максимально сохраняющие структуру и свойства биомолекул. Полупроницаемая мембрана с д-ИДНК, полученная по методике, описанной в разделе 1, обладает воспроизводимыми свойствами и была использована в качестве биочувствительной части амперометрических ДНК-содержащих БС.

Метод определения ионов тяжелых металлов с помощью амперометрического д-ДНК-содержащего БС с использованием комплексообразования в системе металл-комплексон III. Предлагаемая методика определения тяжелых металлов в различных объектах с помощью разработанного БС основана, с одной стороны, на установленном в исследовании высоком сродстве ионов тяжелых металлов к молекулам д-ИДНК и отсутствии неспецифической сорбции на НЦ матрице, что позволяет провести эффективное биоспецифическое концентрирование данных ионов из анализируемого раствора с малой концентрацией на мембране с д-ИДНК в составе БС. С другой стороны, более высокая устойчивость комплексов тяжелых металлов с ЭДТА по сравнению с комплексами М - д-ИДНК позволяет перевести накопленные на биочувствительной части сенсора ионы металлов в раствор путем обработки ее раствором ЭДТА. При этом определяются более низкие концентрации тяжелых металлов, а БС реактивируется для многократного использования. Факт разрушения комплексов ио-

нов тяжелых металлов с д-ИДНК в составе БС под действием ЭДТА доказан вольтамперометрически по появлению пиков восстановления комплексонатов **Pb(II), Cd(II), Cu(II) и Fe(III)** при потенциалах -0,2, -0,4, -0,7 и -0,9 В отн. н.к.э. Величина сигналов зависит от концентрации ионов тяжелых металлов, а при постоянной концентрации ионов тяжелых металлов - от биологической активности ДНК.

Было показано, что д-ДНК после иммобилизации является биологически активной и сохраняет около 80% своей активности 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. Возможность реактивации биочувствительной части сенсора позволяет провести с помощью полученного БС 15-18 измерений. Мембраны с д-ИДНК, потерявшие активность, заменялись на новые. Выбрано оптимальное время реактивации (20 мин) для всех изучаемых металлов.

Проведено определение содержания ионов Pb(II), Cd(II), Cu(II) и Fe(III) в модельных растворах по градуировочным графикам, построенным при выбранных оптимальных условиях. Уравнения градуировочных графиков зависимости $\lg I_n(\text{мкА})$ от $\lg c(\text{моль/л})$ имеют следующий вид: $\lg I_n = (0,33 \pm 0,02) \lg c + (2,9 \pm 0,1)$, $r = 0,9979$, для Pb(II); $\lg I_n = (0,37 \pm 0,02) \lg c + (2,9 \pm 0,1)$, $r = 0,9988$, для Cd(II); $\lg I_n = (0,273 \pm 0,001) \lg c + (2,62 \pm 0,03)$, $r = 0,9996$, для Cu(II); $\lg I_n = (0,31 \pm 0,01) \lg c + (2,39 \pm 0,09)$, $r = 0,9987$ для Fe(III).

Линейная область определяемых концентраций ионов Cu(II), Pb(II), Cd(II) и Fe(III) с помощью БС на основе д-ИДНК составляет $1,0 \times 10^{-5}$ – $4,0 \times 10^{-11}$ моль/л для Cu(II), $1,0 \times 10^{-5}$ – $1,0 \times 10^{-10}$ моль/л для Pb(II), $1,0 \times 10^{-5}$ – $1,0 \times 10^{-9}$ моль/л для Cd(II) и $6,0 \times 10^{-5}$ – $5,0 \times 10^{-9}$ моль/л для Fe(III). Нижняя граница определяемых содержаний (c_n) составляет $4,0 \times 10^{-11}$ моль/л, $1,0 \times 10^{-10}$ моль/л, $1,0 \times 10^{-9}$ моль/л и $5,0 \times 10^{-9}$ моль/л (s_r 0,33) для ионов Cu(II), Pb(II), Cd(II) и Fe(III), соответственно. В случае определения низких концентраций ионов тяжелого металла объем раствора при накоплении можно увеличить.

Достаточная разница в потенциалах восстановления комплексонатов **Cu(II) и Fe(III), или Pb(II) и Cd(II)** и ранее установленный факт их совместной сорбции на БС позволяют определять в растворах данные ионы при их одновременном присутствии (пример в табл.3). Из данных табл. 3 следует, что возможно определение ионов этих металлов с фактором селективности 1:10. Определению не мешает 5-кратный избыток **Fe(III) и Cu(II)** и 10-кратный избыток **Co(II), Ni(II) и Zn(II)**.

Результаты изучения процесса комплексообразования тяжелых металлов с д-ИДНК, найденные оптимальные условия проведения анализа, широкий диапазон определяемых содержаний, возможность селективного определения позволяют использовать данный ДНК-содержащий БС как новое средство биохимического анализа и экологического контроля. С помощью такого БС возможно оценить потенциальную генотоксичность ме-

таллов для ДНК организма и предупредить последствия их воздействия.

Таблица 3

Результаты определения **Pb(II)** и **Cd(II)** в присутствии 5-кратного избытка **Fe(III)** и **Cu(II)** и 10-кратного - **Co(II)**, **Ni(II)** и **Zn(II)** ($n=5$, $P=0,95$)

Введено, $c \times 10^8$, моль/л		Найдено, $(\bar{c} \pm \delta) \times 10^8$, моль/л		s_r	
Pb(II)	Cd(II)	Pb(II)	Cd(II)	Pb(II)	Cd(II)
0,50	0,50	0,6±0,1	0,7±0,2	0,13	0,23
0,50	1,00	0,6±0,1	0,8±0,3	0,13	0,24
0,75	2,25	0,9±0,2	2,5±0,5	0,17	0,16
2,5	25,00	2,3±0,6	25±6	0,21	0,19

Для оценки возможности использования аффинного амперометрического ДНК-содержащего БС для определения низкомолекулярных БАВ, применяемых в качестве лекарственных средств, и для разработки новых БАМ для анализа лекарственных форм и биологических жидкостей изучено взаимодействие ДНК в составе БС с БАВ, обладающими противоопухолевой активностью и имеющими различных механизм воздействия на молекулу ДНК: соединениями Pt(II) и Pt(IV), вступающими в реакцию комплексообразования с азотистыми основаниями ДНК, и индолным алкалоидом аймалином, являющимся интеркалятором ДНК.

БАМ определения комплексов Pt(II) и Pt(IV) на основе амперометрического д-ДНК-содержащего БС. Для платины характерно образование устойчивых связей с азот-содержащими лигандами, что приводит к протеканию нуклеофильного замещения ацидолигандов комплексов Pt(II) (цисплатина) и Pt(IV) (оксоплатина) на азотистое основание ДНК. На вольтамперограммах раствора, содержащего комплекс Pt(II) и БС с д-ИДНК наблюдается катодный пик при потенциале -1,2 В. Комплекс Pt(IV) в присутствии данного БС дает катодный пик при потенциале -0,9 В. Оба пика возрастают прямо пропорционально увеличению концентрации комплексов платины. По описанным в литературе признакам эти сигналы являются КТВВ, возникающими в результате образования каталитически активных комплексов ДНК-Pt(II) и ДНК-Pt(IV).

Извлечение Pt(II) и Pt(IV) из анализируемых объектов происходит за счет их биоаффинного мембранного концентрирования в результате накопления на биочувствительной части БС в виде комплексов с д-ИДНК, что позволяет избежать мешающего влияния сопутствующих компонентов биосред и отказаться от предварительной пробоподготовки, что упрощает методику. Уравнения градуировочных графиков $I_n(\text{мкА})$ - c (моль/л) имеют вид: $I_n = (1,15 \pm 0,04)c_{Pt} \cdot 10^6 + (0,32 \pm 0,01)$, $r = 0,9991$ для Pt(II) и $I_n = (2,21 \pm 0,03)c_{Pt} \cdot 10^6 + (0,65 \pm 0,02)$ $r = 0,9989$ для Pt(IV). Область определяемых

содержаний: для Pt(II) $1,0 \times 10^{-6}$ - $6,0 \times 10^{-9}$ моль/л, для Pt(IV) $1,0 \times 10^{-6}$ - $8,0 \times 10^{-10}$ моль/л. Значения c_n , рассчитанные по 3s-критерию, составляют $5,0 \times 10^{-9}$ моль/л (цисплатин) и $6,0 \times 10^{-10}$ моль/л (оксоплатин).

Разработанный БС позволяет определять содержание цис- и оксоплатина при их совместном присутствии благодаря достаточной разнице потенциалов пиков. Сходимость результатов практически не зависит от соотношения оксоплатин : цисплатин в пробе (табл. 4). Систематическая погрешность не значима даже при 50-кратном избытке цисплатина.

Таблица 4
Результаты определения оксоплатина в присутствии цисплатина
($n=5$, $P=0,95$, $t_{\text{табл}}=2,78$)

Введено оксоплатина, мкг/мл	Соотношение оксоплатин : циспла- тин в пробе	Найдено оксоплатина ($\bar{c} \pm \delta$), мкг/мл	s_r	$t_{\text{расч}}$
0,005	1:1	0,060 \pm 0,015	0,20	1,49
0,012	1:1	0,013 \pm 0,002	0,12	1,40
0,012	1:10	0,015 \pm 0,003	0,16	2,78
0,012	1:50	0,010 \pm 0,002	0,16	2,78

Предложенный амперометрический д-ДНК-содержащий БС может быть использован для анализа растворов, содержащих комплексы Pt(II) и Pt(IV), на стадии синтеза и очистки фармпрепаратов и при разработке методик определения данных соединений в биообъектах.

Метод определения аймалина с помощью амперометрического н-ДНК-содержащего БС. Представляет интерес изучить также взаимодействие н-ДНК, иммобилизованной в составе амперометрического БС на основе СЭ, с индольным алкалоидом аймалином. Известно, что аймалин также обладает цитостатическим эффектом, т.е. ингибирует репликацию и транскрипцию ДНК.

Высота пика электроокисления аймалина на СЭ при + 0,6 В отн. н.к.э. линейно зависит от его концентрации, но в узком интервале концентраций. Для расширения области определяемых концентраций и увеличения чувствительности анализа проведено изучение электрохимического поведения аймалина в присутствии разработанного амперометрического н-ДНК-содержащего БС на основе СЭ, получение которого описано в разделе 1. При введении в раствор аймалина данного БС наблюдается уменьшение высоты анодного пика при + 0,6 В в результате комплексообразования аймалина с н-ДНК, иммобилизованной в составе БС, вероятно, за счет интеркалирования между плоскостями пар комплементарных оснований гуанин (G) цитозин (C) кольцевой системы алкалоида. Образование такого комплекса на поверхности БС свидетельствует о том, что выбранный способ иммобилизации н-ДНК в составе НЦ матрицы максимально сохраняет структуру молекул ДНК и их биологическую активность. Отсутствие спада

пика на вольтамперограммах раствора аймалина, зарегистрированных на СЭ с закрепленной на нем НЦ матрицей, не содержащей н-ДНК (контрольный опыт), свидетельствует об отсутствии неспецифической сорбции аймалина на матрице-носителе и еще раз подтверждает специфичность комплексообразования с н-ДНК. Таким образом, становится возможным проведение эффективного концентрирования аймалина из анализируемого раствора с малой концентрацией на мембране с иммобилизованной нативной ДНК (н-ИДНК) в составе БС.

Линейное увеличение высоты пика окисления аймалина после разрушения образовавшегося в ходе накопления комплекса аймалин - н-ДНК (обработкой БС 0,6 М раствором LiClO_4) с ростом концентрации аймалина позволяет проводить определение данного алкалоида. Выбрано оптимальное время реактивации 10 мин. для разных концентраций алкалоида. Уравнение градуировочного графика зависимости $I_n(\text{мкА})$ от $c(\text{моль/л})$ имеет следующий вид: $I_n = (3,3 \pm 0,1) \times 10^5 c + (1,67 \pm 0,01)$, $r = 0,9997$. Линейная область определяемых концентраций аймалина составляет $1,0 \times 10^{-5}$ - $3,0 \times 10^{-10}$ моль/л. Нижняя граница определяемых содержаний составляет $3,0 \times 10^{-10}$ моль/л (s_r 0,33). Ошибка определения не превышает 10%. В случае определения низких концентраций аймалина объем раствора при накоплении можно увеличить.

В результате разработан БАМ определения низкомолекулярного фактора ДНК - интеркалятора аймалина с помощью амперометрического н-ДНК-содержащего БС, найдены оптимальные условия его проведения. Время анализа - 25-30 мин. Следует отметить, что селективное определение аймалина данным БАМ возможно в присутствии других алкалоидов, потенциал окисления которых отличается не менее, чем на 250 мВ от потенциала окисления аймалина. В противном случае требуется дополнительная пробоподготовка.

Данный н-ДНК-содержащий БС может быть использован и для определения других алкалоидов и цитостатиков, способных встраиваться и интеркалировать между цепями ДНК, а рассмотренный ранее в этой главе д-ДНК-содержащий БС может быть использован для определения цитостатиков, способных образовывать с азотистыми основаниями ДНК ковалентные связи.

4. БАМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БАВ; ПРИМЕНЕНИЕ РАЗРАБОТАННЫХ АФФИННЫХ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИХ БС В ИММУНОАНАЛИЗЕ И В КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКЕ ЕГО СПЕЦИФИЧНОСТИ

Определение АТ к ДНК (когда ДНК выступает в роли антигена (АГ)), в частности аутоАТ, вырабатываемых организмом к собственной ДНК, позволяет моделировать участие ДНК в иммунологических реакциях и разрабатывать методы диагностики различных заболеваний, в том числе аутоиммунных. Определение АТ к низкомолекулярным БАВ, например,

алкалоидам (аймалину), дает возможность проводить их идентификацию в биологических субстратах и изучать механизм действия лекарственных средств. При разработке БАМ определения АТ оценена эффективность различных систем распознавания и детекции комплексов ДНК-АТ и аймалин-АТ, образующихся при иммунологической реакции, и способов усиления сигнала, получаемого в результате данного биоаффинного взаимодействия.

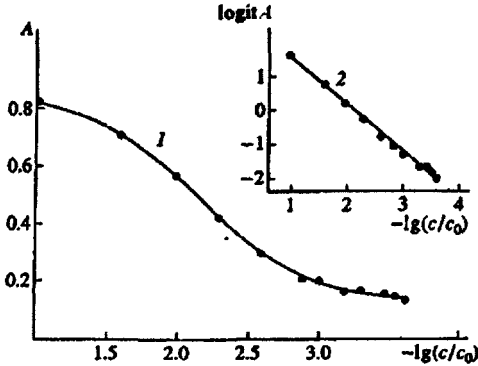


Рис.3. Зависимость оптической плотности раствора A при ИФА АТ к аймалину от степени его разведения $-\lg(c/c_0)$, где c_0 - концентрация АТ к аймалину до разведения, c - концентрация АТ после разведения: 1 - полулогарифмическая кривая; 2 - линейризованная зависимость в координатах $\text{logit } A$ от $-\lg(c/c_0)$, где $\text{logit } A = \ln(A/(1-A))$

БАМ определения АТ к аймалину на основе иммуоферментного анализа (ИФА). ИФА основан на выявлении с помощью ферментной метки иммунокомплексов АГ-АТ. В отличие от макромолекул, которые, попадая в организм, стимулируют выработку АТ (или IgG), низкомолекулярные соединения, или гаптены, сами по себе не обладают иммуногенностью. Поэтому возникает необходимость получения к ним высокоспецифичных АТ.

Для придания аймалину иммуногенности необходимо конъюгирование его с высокомолекулярным носителем, например, БСА. Аймалин с БСА связывали методом ковалентной сшивки с помощью глутарового альдегида, что позволяет проводить реакцию связывания в мягких условиях с минимальной потерей иммуногенной активности. При получении комплексов аймалин-БСА варьировали рН растворов, время перемешивания, соотношение компонентов. Были получены два типа комплексов, отличающихся последовательностью приливания реагентов: К1 - с предварительной активацией носителя (БСА) глутаровым альдегидом, К2 - с последующей обработкой глутаровым альдегидом комплекса БСА с аймалином. Ковалентное связывание аймалина с БСА подтверждено тонкослойной хроматографией и спектрофотометрией. Степень связывания в комплексе К1 составляет 85%, а в К2 - 90%. Таким образом установили, что полученные комплексы содержат достаточное количество связанного аймалина и могут быть использованы для иммунизации животных.

Выделенные из сыворотки крови IgG контролировали на специфичность к аймалину реакцией иммуноэлектроосмосфореза (РИЭОФ) и методом ИФА с помощью конъюгатов аймалин-БСА, сорбированных на поли-

стирольных планшетах (табл.5). Из данных табл. 5 следует, что АТ2, выработанные к комплексу К2 менее специфичны, так как вступают в иммунологическую реакцию с БСА. Они оказались и менее стабильными: их иммунологическая активность падает в 1,5 раза при хранении при -18°C в течение года. Поэтому в ходе дальнейшего исследования определяли лишь АТ1 к комплексу К1.

Таблица 5.
Результаты определения специфичности АТ к аймалину с помощью реакции иммуноэлектроосмофореза (РИЭОФ) и ИФА ($n = 7, P = 0,95$)

Тип антител	Тип антигена	Перекрестное связывание антител с антигеном			
		РИЭОФ	ИФА*, \bar{x}	s_r	$\pm\delta$
АТ1	К1	+	0,19	0,07	0,01
	К2	-	0,060	0,10	0,006
	БСА	-	0,09	0,12	0,01
АТ2	К1	-	0,059	0,11	0,006
	К2	+	0,17	0,08	0,01
	БСА	+	0,13	0,09	0,01

* $\lambda = 492 \text{ нм}, A_0 = 0,054$ (A в отсутствие IgG к аймалину)

Для определения АТ к аймалину и доказательства их специфичности именно к данному алкалоиду в присутствии БСА и алкалоидов, сходных с аймалином по химическому строению, разработана *методика иммуноферментного определения АТ к аймалину* с разделением компонентов иммунореакции и усилением сигнала с помощью ферментной метки - пероксидазы хрена (ПХ), которая заключается в предварительной активации планшета глутаровым альдегидом и сорбции аймалина в течении 2 ч. После инкубации и отмывки добавляют АТ к аймалину, инкубируют 1,5 ч, отмывают и наносят антивидовой конъюгат IgG , меченных ПХ. Добавляют субстратную смесь ОФД и перекиси водорода, измеряют A раствора при $\lambda = 492 \text{ нм}$ и строят зависимость A от $-\lg(c/c_0)$. (рис.3).

Из рис.3 видно, что с помощью ИФА со спектрофотометрической индикацией аналитического сигнала возможно определение АТ к аймалину до разведения $1 : 4096$, соответствующего значению $-\lg(c/c_0) = 3,62$, что подтверждает высокую иммуногенность аймалина, модифицированного БСА. Разработанный БАМ использован для изучения специфичности полученных АТ. Установлено, что процент перекрестного связывания алкалоидов, сходных по строению с аймалином с АТ к аймалину составляет $0 - 1,0\%$, а с $17\text{-}0\text{-}$ ацетилаймалином - 87% (в описанном в литературе способе - 90%).

Таким образом, разработаны способ получения АТ к аймалину и им-

муноферментный метод их определения, которые в дальнейшем позволят создать БАМ для обнаружения низкомолекулярных соединений с высокой чувствительностью и специфичностью, и дадут возможность проведения их массового анализа без предварительной подготовки образцов.

Использование разработанного амперометрического ДНК-содержащего иммуноферментного сенсора (ИФС) для определения АТ к ДНК. Процесс ферментативного катализа был также использован для чувствительной детекции протекания иммунологической реакции с участием АТ к ДНК. Суть метода заключается в применении амперометрического ИФС, где в НЦ мембране вблизи поверхности СРПЭ совместно иммобилизованы ХЭ и д-ДНК. При наличии в анализируемом растворе, содержащем субстрат ХЭ - бутирилтиохолин иодид (БТХИ), антител, происходит их специфичное связывание с молекулами д-ИДНК с образованием иммунокомплексов.

При этом активные центры иммобилизованной ХЭ (ИХЭ) стерически блокируются, снижается скорость ферментативного гидролиза БТХИ, один из продуктов которого (тиол) образует электрохимически активный при $-0,55$ В меркаптид ртути. В результате уменьшается величина аналитического сигнала - тока восстановления меркаптида ртути. При этом доказано отсутствие неспецифического связывания аутоАТ с НЦ матрицей. Показано, что наилучшими свойствами для использования в составе ИФС (устойчивостью при хранении, стабильностью в работе, отсутствием вымывания компонентов) обладает мембрана из НЦ состава (масс.%): ХЭ - 10,6-12,6; д-ДНК - 0,94-1,86; глутаровый альдегид - 17,5-18,0. Схема ИФА с использованием ИФС представлена на рис. 4

Разработанный БАМ на основе ИФС (табл.6) был использован для определения концентрации аутоАТ (АТ к компонентам собственного организма), которые специфичны именно к д-ДНК, и диагностики аутоиммунного заболевания алеутской болезни норок, которая относится к вирусной инфекции, приводящей к резкому увеличению содержания аутоАТ к ДНК в сыворотке крови.

Он является хорошей альтернативой длительному и трудоемкому ИФА на планшете с разделением компонентов (см. выше ИФА аймалина), т.к. ИФС является одновременно иммунологической твердой фазой, содержит фермент-маркер (ХЭ) и обеспечивает возможность электрохимической детекции продуктов ферментативной реакции. Практически мгновенный отклик электрода позволяет использовать метод для быстрой детекции наличия или отсутствия аутоАТ. Селективность подтверждена отсутствием реакции системы на введение IgG человека и крупного рогатого скота (КРС). Обработка раствором $MgCl_2$ на 100% реактивирует биосенсорную часть ИФС, обеспечивая многократность его применения.

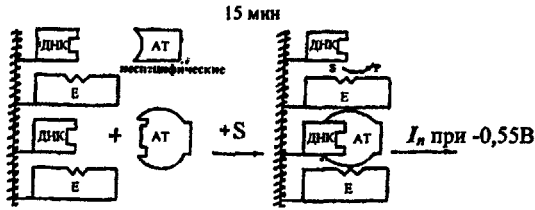


Рис.4. Схема ИФА антител к ДНК с помощью ИФС (Е - фермент ХЭ, S и P- субстрат и продукт ферментативной реакции)

ИФА с применением модуляторов ферментов (ИФАМ) и ферментного сенсора (ФС) для определения АТ к ДНК. В данном БАМ используется ФС на основе ИХЭ и СРПЭ, который регистрирует изменение в каталитической активности фермента. Здесь была применена система биоаффинного распознавания: фермент - модулятор его активности, специфический ингибитор. Для данного БАМ была разработана оригинальная методика ковалентного связывания д-ДНК в конъюгаты с обратимыми фосфорорганическими ингибиторами (хлорофосом или БОФК), сохраняющая их модуляторные свойства. В отсутствие аутоАТ в растворе ингибитор в составе конъюгата подавляет активность ИХЭ, что приводит к спаду аналитического сигнала при $-0,55$ В (см. предыдущий раздел). Вводимые в анализ АТ образуют иммунокомплексы с ДНК в конъюгате, что приводит к стерическому экранированию ингибитора и его неспособности воздействовать на ход ферментативной реакции на ФС (рис.5). Наилучшими свойствами обладают конъюгаты ингибитор-д-ДНК следующего состава (масс. %): а) 0,0048 д-ДНК, 0,60 БОФК, 2,91 глутарового альдегида, 47,81 воды, остальное — КББ с рН 9,6; б) 0,0094 д-ДНК, 0,012 хлорофоса, 4,30 глутарового альдегида, остальное — КББ с рН 9,6.

Разработанный ингибиторный ИФАМ без разделения компонентов с ингибитором — маркером ДНК использован для диагностики АБН (см.табл.6). Линейный участок градуировочного графика в интервале концентраций от 1×10^{-8} до $1,2 \times 10^{-7}$ моль/л в присутствии конъюгата БОФК — д-ДНК и до $1,0 \times 10^{-7}$ моль/л в присутствии конъюгата хлорофос — д-ДНК использовали для определения АТ и оценки степени тяжести заболевания.

Селективность БАМ подтверждена отсутствием реакции системы на введение IgG лошади и КРС. Обработка раствором гидроксилamina на 100% реактивирует биосенсорную часть ИФС, обеспечивая многократность его применения.

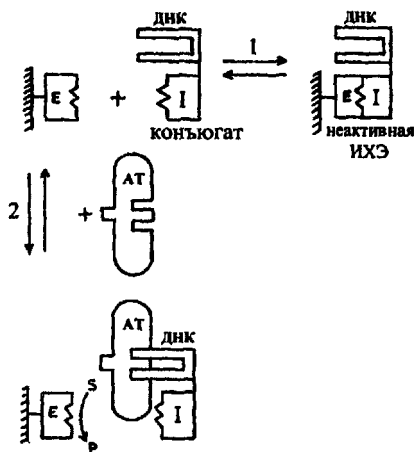


Рис.5. Схема ИФАМ с использованием амперометрического ФС на основе ИХЭ. (Е - фермент ХЭ; I - ингибитор)

Аффинный амперометрический ДНК-содержащий БС в иммуноанализе АТ к ДНК. В следующем БАМ определения АТ был применен амперометрический ДНК-содержащий БС, а КТВВ, описанные ранее при образовании комплекса д-ДНК-Рt, использовались для каталитического усиления сигнала биоаффинного взаимодействия ДНК-аутоАТ. Система биоаффинного распознавания здесь, кроме ДНК-АТ, ДНК-ион тяжелого металла или его комплекс, обладающие высоким сродством к ДНК, а Pt(II) служит меткой ДНК для контроля прохождения иммунореакции. При внесении вышеуказанного БС в раствор, содержащий комплекс Pt(II) (использовали цисплатин), на БС образуются каталитически активные комплексы ДНК-Рt(II), обуславливающие появление пика КТВВ на вольтамперограмме при -1,2В. Вводимые в раствор АТ, специфически связываясь с д-ИДНК в иммунокомплексы, экранируют ее комплексы с Pt(II), приводя к уменьшению регистрируемого сигнала в зависимости от концентрации АТ до полного его исчезновения, что соответствует полному экранированию и насыщению мест связывания ДНК антителами.

При дальнейшем росте содержания АТ при избытке Pt(II) в растворе наблюдается появление и рост второй волны с параметрами КТВВ при -1,4В, которая обусловлена появлением каталитически активных комплексов АТ-Рt(II)(рис.6,7).

На основе данного БАМ разработана методика определения аутоАТ к ДНК в диапазоне концентраций, указанных на рис.7, по КТВВ при -1,2В и -1,4В, и диагностики аутоиммунных заболеваний, для которой второй, менее специфичный, сигнал дает возможность количественной оценки степени тяжести заболевания при однозначной клинической картине. Селективность разработанного БАМ твердофазного иммуноанализа аутоАТ к ДНК без разделения компонентов (характеристики см. табл.6) в указанном

диапазоне концентраций АТ подтверждена отсутствием отклика системы на антитела сыворотки крови кролика и КРС. Разработаны условия реактивации БС раствором $MgCl_2$.

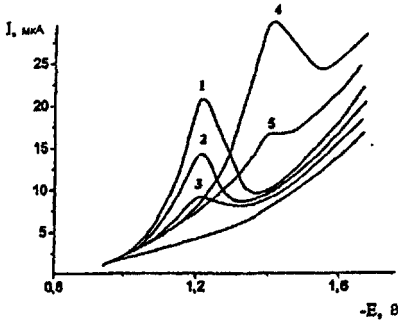


Рис.6. Вольтамперограммы растворов комплексов Pt(II): в отсутствие АТ, специфичных к ДНК (1); в присутствии $0,7 \times 10^{-9}$ моль/л АТ к ДНК (2); $1,3 \times 10^{-9}$ моль/л АТ к ДНК (3); $7,0 \times 10^{-8}$ моль/л АТ к ДНК (4); $1,3 \times 10^{-9}$ моль/л АТ к ДНК (5). ФСБ рН 6,7; $c_{Pt(II)} = 1,0 \times 10^{-5}$ моль/л; амперометрический ДНК-содержащий БС (1-3), СРПЭ (4,5); $v = 1$ В/с

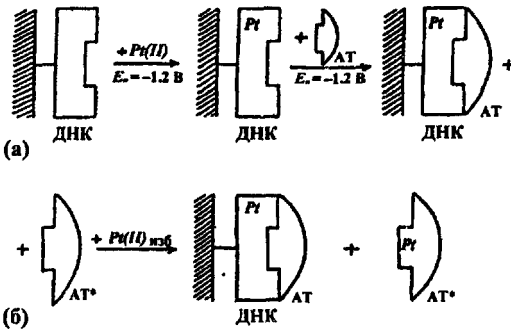


Рис.7. Схема иммуноанализа АТ к ДНК с помощью амперометрического ДНК-содержащего БС: (а) при $c_{AT} 5,0 \times 10^{-10} - 1,3 \times 10^{-9}$ моль/л; (б) при $c_{AT} 1,3 \times 10^{-9} - 7,0 \times 10^{-8}$ моль/л. АТ* - несвязанные АТ в растворе при $c_{AT} > 1,3 \times 10^{-9}$ моль/л.

Константы связывания бнотспецифического взаимодействия ДНК-аутоАТ. Для количественной оценки специфичности взаимодействия ДНК с аутоАТ и специфичности иммуноанализа определяли аффинную константу образования иммунного комплекса - константу связывания ($K_{связ.}$) с помощью графика Скэтчарда (рис.8). Концентрация ДНК в системе была постоянна. $[AT^*]$ и $[AT-ДНК]$ находили с использованием ДНК-содержащего БС по величине сигналов КТВВ при -1,2 и -1,4В. $K_{связ.}$ аутоАт-ДНК, найденные из тангенса угла наклона двух участков зависимости Скэтчарда, соответствующих взаимодействию с ДНК двух популяций аутоАт с различным сродством к ДНК (см. рис. 8), составили ($n = 3$; $P = 0,95$): $K_{1связ.} = (1,25 \pm 0,02) \times 10^9$ л/моль и $K_{2связ.} = (2,50 \pm 0,03) \times 10^8$ л/моль.

Характеристика разработанных БДМ определения АТ к ДНК

Таблица 6

Метод определения	Метка	Биоаффинное распознавание	Способ каталитического усиления чувствительности детекции иммунокомплексов	Регистрируемый аналитический сигнал	Диапазон определяемых концентраций, моль/л	Нижний предел обнаружения, моль/л	Время проведения анализа, мин	Ошибка определения, %
ИФС	ХЭ	ДНК-АТ E-S	Ферментативный	I_n при -0,55В	$1,0 \times 10^{-9}$ - $7,0 \times 10^{-9}$	$5,0 \times 10^{-10}$	15	4
ИФАМ	Интгибитор ХЭ	ДНК-АТ E-1	Ферментативный	I_n при -0,55В	$1,0 \times 10^{-8}$ - $1,0 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-8}$	30	4
ДНК- содержащий BC	Комплекс P(II)	ДНК-АТ ДНК-М	КТВВ	I_n при -1,2В и -1,4В	$5,0 \times 10^{-10}$ - $7,0 \times 10^{-8}$	$3,0 \times 10^{-10}$	20-30	7
Тест- система на основе НЦ мембраны	ПХ	ДНК-АТ E-S	Ферментативный	I_n при 370 нм	$7,4 \times 10^{-12}$ - $1,5 \times 10^{-4}$	$7,4 \times 10^{-12}$	30	4

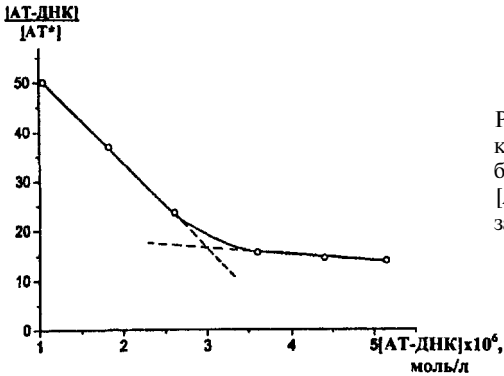


Рис.8. График Скетчарда для комплексообразования иммобилизованной ДНК с АТ. [АТ*] - концентрация несвязанных АТ

Полученные высокие $K_{связ.}$ свидетельствуют об образовании прочных специфичных иммунокомплексов ДНК-АТ и подтверждают специфическое сродство аутоАТ к фосфатно-сахаридному скелету молекул ДНК.

5. БАМ НА ОСНОВЕ АМПЕРОМЕТРИЧЕСКОГО ИММУНОСЕНСОРА И ДНК-ЗОНДА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДНК И ЕЕ ФРАГМЕНТОВ И НА ОСНОВЕ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ СО СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЙ И ВИЗУАЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИЕЙ АНАЛИТИЧЕСКОГО СИГНАЛА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИЗКО- И ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ БАВ

В настоящее время огромное значение имеет изучение процессов с участием ДНК, ее фрагментов, и разработка методов высокоспецифичного определения и идентификации молекул ДНК, ее полинуклеотидных цепей.

Иммуносенсор (ИС) для определения д-ДНК; ДНК-зонд для определения последовательности нуклеотидов в процессе гибридизации. Для определения д-ДНК использован принцип высокоспецифичного (согласно установленным значениям $K_{связ.}$) биоаффинного распознавания д-ДНК молекулами аутоАТ с использованием каталитического процесса с участием комплекса Pt(II), являющегося меткой аутоАТ.

Предложен биоаффинный амперометрический ИС на основе СРПЭ, в биочувствительной части которого содержатся иммобилизованные аутоАТ специфичные к д-ДНК и образующие с ней иммунокомплексы, что лежит в основе определения. Оптимальное содержание компонентов в биочувствительной части ИС следующее (масс.%): антитела - 2,25-2,55; глутаровый альдегид - 17,5-18,0; НЦ - остальное. Вольтамперограммы и схема иммуноанализа имеют вид, аналогичный приведенным на рис.8 и рис. 9а. Диапазон определяемых концентраций д-ДНК составляет 0,5-10,0 мкг/мл.

Разработан БАМ на основе ДНК-зонда, т.е. БС, использующего биоаффинное распознавание последовательностей олигонуклеотидов (ОДН) комплементарных к иммобилизованной на БС. ДНК-зонд представляет собой СЭ, на рабочей поверхности которого находится биоаффинная

НЦ матрица с включенными в ее полимерную сетку и ковалентно иммобилизованными олигонуклеотидами специально разработанным способом с помощью глутаральдегида (получение описано в разделе 1).

При изучении гибридизации ДНК в процессе образования гибридного комплекса (схема на рис.9) между иммобилизованным модельным ОДН и целевым в анализе за счет образования водородных связей между парами аденин(А)- тимин(Т), гуанин(Г)-цитозин(С) использовано ферментативное усиление биоаффинного сигнала. Для этого использовано биоаффинное взаимодействие биотина, как метки ОДН, со стрептавидином, меченным

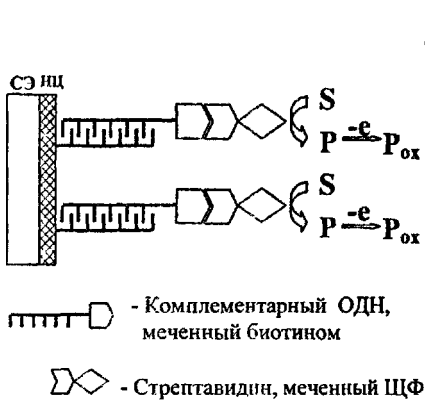


Рис.9. Схема гибридизации на амперометрическом ДНК-зонде на основе СЭ и олигонуклеотида, иммобилизованного в составе НЦ мембраны.

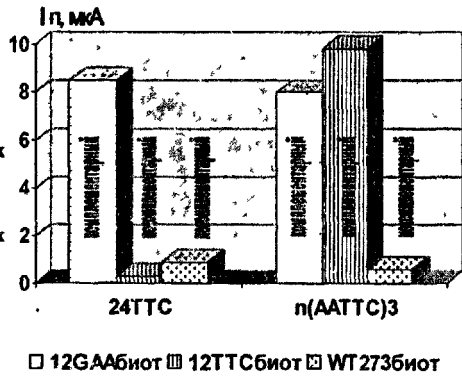


Рис. 10. Сравнение величин тока пика при гибридизации с комплементарными и некомплементарными биотинированными олигонуклеотидами а поверхности ДНК-зонда, содержащего иммобилизованные олигонуклеотиды 24ТТС или п(ГААТТЦ)3

щелочной фосфатазой (ЩФ), Образующийся при ферментативной реакции 1-нафтил-фосфата (субстрата ЩФ) 1-нафтол электрохимически активен и дает пик окисления на СЭ при потенциале +0,4В отн. х.с.э.

Все эксперименты с использованием ДНК-зонда проводились параллельно с использованием контрольного электрода, т.е. СЭ, на поверхности которого находилась НЦ мембрана, не содержащая ОДН, для контроля отсутствия неспецифической сорбции на НЦ. В результате подбора условий проведения эксперимента было достигнуто соотношение полезного и контрольного сигнала (отрицательный контроль) 20:1.

Наилучшие результаты, т.е. максимальный полезный электрохимический сигнал (ток пика) после процесса гибридизации получены при следующих подобранных условиях: иммобилизации олигонуклеотида с концентрацией 444 мкг/мл, блокировании ДНК-зонда 5%-ным раствором БСА

при перемешивании в течение 5 мин и инкубации после гибридизации в растворе субстрата также при перемешивании в течение 5 мин.

Специфичность процесса гибридизации, протекающего на разработанном ДНК-зонде, подтверждали двумя способами. В первом способе изучали взаимодействие комплементарного и некомплементарного биотинированных олигонуклеотидов с олигонуклеотидом, входящим в состав ДНК-зонда (рис. 10). Во втором - на ДНК-зонде иммобилизовался олигонуклеотид либо комплементарный, либо некомплементарный по отношению к вводимому в процессе анализа, меченному биотином олигонуклеотиду. Последовательность и условия всех операций при этом была одинаковая. О специфичности процесса гибридизации на ДНК-зонде свидетельствует большая разница величин электрохимических сигналов в присутствии комплементарного и некомплементарного ОДН в обоих случаях.

Таким образом, разработанный амперометрический ДНК-зонд на основе СЭ с использованием предложенного способа иммобилизации ОДН на его поверхности позволяет изучать процесс гибридизации ДНК достаточно быстро (15-20 мин) и высокоспецифично.

Для проведения массовых анализов биологических, пищевых и природных объектов на содержание БАВ, в том числе в медицине, ветеринарии и экологическом анализе, все чаще используются одноразовые тест-системы. Поэтому актуальна разработка таких высокоселективных, чувствительных и экспрессных систем для определения низко- и высокомолекулярных БАВ.

В работе предложены биоаффинные тест-системы со спектрофотометрической регистрацией аналитического сигнала на основе гетерогенного твердофазного ИФА с разделением компонентов иммунологической реакции. При этом иммунологической твердой фазой служили готовые мембраны из НЦ, поскольку НЦ, как указывалось в разделе 3, обладает большой сорбционной емкостью и низкой неспецифической сорбцией. Для усиления сигнала биоаффинного взаимодействия АГ-АТ использована ферментативная каталитическая система ПХ-субстратная смесь диаминобензидина (ДАБ) с H_2O_2 . Особое значение для широкого практического использования этих тест-систем имеет их использование в виде экспресс-тестов с визуальной оценкой результатов анализа.

Использование разработанных БАМ на основе тест-систем для определения низкомолекулярных БАВ рассмотрено на примере алкалоида аймалина, а для определения высокомолекулярных БАВ на примере определения аутоАТ к ДНК.

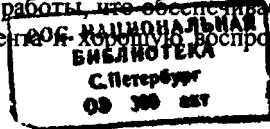
Имуноферментная тест-система для определения аймалина. При разработке метода ковалентной иммобилизации аймалина на готовых НЦ мембранах варьировали концентрацию бифункционального реагента глутарового альдегида, концентрацию аймалина в образцах, время иммобилизации и условия высушивания мембран. Методика проведения ИФА аймалина с помощью тест-системы на модифицированных НЦ мембранах за-

ключается в нанесении капилляром раствора аймалина, высушивании мембраны, обработки БСА для предотвращения неспецифической сорбции, инкубации с раствором полученных в данной работе специфичных к аймалину АТ, инкубации промытой мембраны в растворе вторичных АТ, меченных ПХ. После этого мембрану проявляли погружением в субстратную смесь ПХ, содержащую ДАБ и H_2O_2 . Интенсивность окраски пятна оценивали по оптической плотности при 370 нм. Градуировочный график строили в координатах $\lg \Delta A - \lg c$ аймалина, где ΔA - разность оптической плотности образца и оптической плотности фона (без аймалина). Погрешность определения не превышает 6%. Нижняя граница определяемых содержаний составляет $4,0 \times 10^{-9}$ моль/л.

Благодаря высокой специфичности АТ к аймалину, полученных по предложенной в работе методике (см. раздел 5), отпадает необходимость в проведении дополнительной пробоподготовки образцов перед ИФА аймалина с использованием АТ.

Имуноферментная тест-система для определения АТ к ДНК. Принципы, положенные в основу данного БАМ, аналогичны предыдущему методу: разработанная методика модификации готовых НЦ мембран основана на ковалентной пришивке д-ДНК с помощью глутарового альдегида. Модифицированная НЦ матрица выступает в качестве иммунологической твердой фазы, а иммобилизованная на ней д-ДНК - в качестве АГ. При изучении сорбции ДНК на НЦ мембранах с целью выявления аутоАТ варьировались такие параметры, как концентрация ДНК, состав и рН буферной системы, время иммобилизации, концентрация глутарового альдегида и т.д. Схема ИФА для определения аутоАТ на полученном иммуносорбенте на основе модифицированных НЦ мембран аналогична схеме ИФА на планшетах. После иммобилизации ДНК проводят иммунологическую реакцию с аутоАТ, степень прохождения которой контролируют с помощью вторичных АТ, меченных ПХ. ПХ катализирует взаимодействие ДАБ с H_2O_2 , приводящее к образованию нерастворимого в воде окрашенного продукта, который сорбируется на поверхности мембраны. Градуировочный график строился в координатах $\text{logit } \Delta A - (-\lg c_{AT})$, где $\text{logit } \Delta A = \ln(\Delta A / (1 - \Delta A))$. Разработанный вариант тест-системы для проведения ИФА АТ к ДНК был использован для определения в реальных образцах содержания аутоАТ, вырабатываемых при АБН, в широком диапазоне концентраций от $1,5 \times 10^{-4}$ до $7,4 \times 10^{-12}$ моль/л, что позволяет оценить степень тяжести заболевания. Ошибка определения не превышает 4%. Время определения - 30 мин. Нижняя граница определяемых содержаний составляет $7,4 \times 10^{-12}$ моль/л. Специфичность анализа подтверждается отсутствием отклика на иммуноглобулины КРС, кролика и свиньи.

Следует отметить ряд преимуществ разработанных БАМ на основе иммуноферментных тест-систем с использованием модифицированных НЦ мембран. За счет ковалентной иммобилизации иммунорегент не вымывается из мембраны в процессе работы, что обеспечивает однородность рабочей поверхности иммуносорбента и высокую воспроизводимость ре-



зультатов. Способ нанесения на мембрану исследуемых образцов менее трудоемок, чем на планшет: достаточно прикоснуться капилляром с пробой к мембране. Мал расход исследуемого образца (0,5 мкл). Отсутствует стадия отмывания несвязавшихся неспецифических АТ. Обработка мембраны при полном ее погружении в растворы конъюгата и субстрата облегчает анализ и приводит к экономии конъюгата, т.к. он может быть использован повторно без потери иммунологической активности. Разработанные тест-системы удобны в использовании, экспрессны и просты при массовых анализах при высокой чувствительности и специфичности. Время анализа сокращается от 4-х и более часов до 30 мин (без учета нанесения образцов и приготовления мембраны). Высушенные после проведения анализа мембраны можно использовать для протоколирования результатов тестирования.

Сравнительная характеристика разработанных БАМ определения АТ к ДНК. В таблице 6 обобщены характеристики разработанных БАМ определения АТ к ДНК. Все разработанные БАМ с использованием различных вариантов биоаффинного распознавания и усиления чувствительности детекции иммунокомплексов ДНК-аутоАТ позволяют определять аутоАТ с высокой специфичностью и достаточной чувствительностью. Ошибка определений не превышает 7%. Все методы достаточно просты в использовании, работа в кинетическом режиме при перемешивании сокращает время анализа до 15-30 мин. Для определений требуется малый объем анализируемой сыворотки крови: от 0,5 до 3 мкл.

Поэтому все данные БАМ могут быть использованы для анализа реальных многокомпонентных образцов сыворотки крови без дополнительной пробоподготовки. Применение БАМ на основе тест-систем позволяет проводить визуальную оценку и протоколирование результатов.

Разработанные БАМ могут быть использованы для определения любых аутоАТ и, следовательно, для диагностики ряда аутоиммунных заболеваний. Кроме того, вместо ДНК могут быть использованы любые АГ, а следовательно отсутствуют принципиальные ограничения в выборе анализируемой иммунологической пары АГ - АТ.

6. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАМ НА ОСНОВЕ ДНК ДЛЯ АНАЛИЗА РЕАЛЬНЫХ ОБЪЕКТОВ

Разработанные БАМ на основе ДНК как биоспецифического аналитического реагента с использованием амперометрических БС и спектрофотометрических тест-систем применены для определения низко- и высокомолекулярных эффекторов ДНК в биологических, пищевых и природных объектах. Определение низкомолекулярных эффекторов проведено на примере тяжелых металлов и противоопухолевых препаратов. Определение высокомолекулярных эффекторов проведено на примере аутоАТ АБН.

БАМ на основе амперометрических ДНК-содержащих БС и спектрофотометрической тест-системы для определения низкомоле-

кулярных эффекторов ДНК - тяжелых металлов и противоопухолевых препаратов.

Тяжелые металлы в пищевых, экологических и биологических объектах. Разработаны методы определения тяжелых металлов Pb(II), Cd(II), Cu(II) и Fe(III) в реальных объектах, основанные на БАМ с использованием ДНК-содержащего БС. Полученные данные сравнивались с результатами независимых методов. Расхождения между средними величинами концентраций БАВ в различных объектах, найденных независимыми методами, незначимы и хорошо согласуются по t- и F-критериям. Систематическая погрешность в разработанных БАМ незначима.

Для примера в табл. 7 представлены некоторые результаты определения Pb(II) и Cd(II) в пищевых и природных объектах. Определение ионов Cu(II), Pb(II), Cd(II) и Fe(III) в реальных образцах с помощью БС возможно на уровне ПДК (в частности, ПДК в молоке: 0,1 мг/дм³ для Pb(II) и 0,03 мг/дм³ для Cd(II); в питьевой воде: 0,03 мг/дм³ ($1,4 \times 10^{-7}$ моль/л) для Pb(II) и 0,001 мг/дм³ ($8,9 \times 10^{-9}$ моль/л) для Cd(II)) и на уровне меньших концентраций.

Разработанный БАМ на основе амперометрического ДНК-содержащего БС был использован в анализе сыворотки крови человека на содержание тяжелых металлов: Fe(III), Cu(II), Pb(II) и Cd(II). Для этого проводили накопление данных ионов на ДНК-содержащем БС из растворов, содержащих 3 мкл сыворотки крови человека. Проведено определение данных ионов при совместном присутствии (за счет их одновременной сорбции на д-ИДНК и достаточной разницы потенциалов восстановления комплексонов металлов), оценено влияние матричных компонентов на определения. Пример приведен в табл. 8.

В табл. 7 на примере анализа сыворотки крови (образцы 3 и 7) показана возможность совместного определения ионов Cu(II) и Fe(III), что особенно ценно для диагностики анемии. Данный БАМ может быть использован как дополнение к известным методам контроля содержания данных ионов в организме человека, а также служить для определения содержания в биологических жидкостях онкопрепаратов на основе Cu(II) и Fe(III). БАМ на основе амперометрического ДНК-содержащего БС имеет ряд преимуществ: он проще, не требует длительной пробоподготовки, экспресснее, чувствительнее и селективнее, при анализе сыворотки крови требуется минимальный объем пробы и позволяет определить несколько элементов одновременно из одной пробы.

Платиносодержащие противоопухолевые препараты в сыворотке крови. Предложенный в данной работе БАМ определения комплексов Pt(II) и Pt(IV) на основе амперометрического ДНК-содержащего БС использовали для анализа сыворотки крови на содержание онкопрепаратов. Определения проводили по градуировочным графикам, построенным по значениям высоты пиков КТВВ при -0,9 В для Pt(IV) и -1,2 В для Pt(II) (табл. 9). Правильность методики проверена способами удвоения массы пробы и введения добавки определяемого компонента.

Таблица 7.

Результаты определения тяжелых металлов Cu(II), Pb(II), Cd(II) и Fe(III) 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	M	Вольтамперометрия на БС		Контрольный метод		$t_{\text{расч}}$	$F_{\text{расч}}$
		Найдено, $\bar{x} \pm \delta$ мг/мл	s_r	Найдено, $\bar{x} \pm \delta$ мг/мл	s_r		
Речная вода	Cu	$(0,44 \pm 0,05) \times 10^{-3}$ мг/мл	0,09	$(0,45 \pm 0,05) \times 10^{-3}$ мг/мл	0,09	0,40	1,01
	Cd	$(2,8 \pm 0,1) \times 10^{-3}$ мг/мл	0,03	$(2,7 \pm 0,2) \times 10^{-3}$ мг/мл	0,06	1,22	3,72
Озерная вода	Cu	$(0,28 \pm 0,03) \times 10^{-3}$ мг/мл	0,08	$(0,32 \pm 0,02) \times 10^{-3}$ мг/мл	0,05	1,88	2,3
	Cd	$(4,1 \pm 0,3) \times 10^{-3}$ мг/мл	0,06	$(3,8 \pm 0,4) \times 10^{-3}$ мг/мл	0,08	1,53	1,72
Питьевая вода до фильтра	Pb	$(3,8 \pm 0,5) \times 10^{-7}$ моль/л	0,11	$(3,6 \pm 0,4) \times 10^{-7}$ моль/л	0,10	1,41	1,33
Питьевая вода после фильтра	Pb	$(4,2 \pm 0,7) \times 10^{-8}$ моль/л	0,13	$(3,8 \pm 0,5) \times 10^{-8}$ моль/л	0,12	1,37	1,02
Молоко №1	Pb	$0,021 \pm 0,002$ мг/л	0,08	$0,019 \pm 0,001$ мг/л*	0,04	2,5	1,75
Молоко №2	Pb	$0,052 \pm 0,003$ мг/л	0,05	$0,047 \pm 0,002$ мг/л*	0,03	2,8	1,25
Молоко №3	Pb	$0,043 \pm 0,003$ мг/л	0,06	$0,040 \pm 0,002$ мг/л*	0,04	2,1	1,65
Сыворотка 1	Fe	$(0,9 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ моль/л	0,18	$(0,7 \pm 0,1) \times 10^{-5}$ моль/л*	0,10	2,31	5,4
Сыворотка 2	Fe	$(1,2 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ моль/л	0,17	$(1,4 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ моль/л*	0,09	1,87	2,6
Сыворотка 3	Fe	$(2,2 \pm 0,4) \times 10^{-5}$ моль/л	0,15	$(2,3 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ моль/л*	0,08	0,58	3,2
	Cu	$(1,6 \pm 0,1) \times 10^{-5}$ моль/л	0,05	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ моль/л*	0,10	1,27	4,0
Сыворотка 4	Pb	$0,006 \pm 0,001$ мг/мл	0,13	$0,007 \pm 0,002$ мг/мл*	0,23	1,25	4,19
Сыворотка 5	Pb	$0,011 \pm 0,002$ мг/мл	0,14	$0,013 \pm 0,003$ мг/мл*	0,18	1,60	2,31
	Cd	$0,005 \pm 0,002$ мг/мл	0,32	$0,004 \pm 0,001$ мг/мл*	0,20	0,79	4,00
Сыворотка 6	Cd	$0,010 \pm 0,002$ мг/мл	0,16	$0,012 \pm 0,004$ мг/мл*	0,27	1,24	4,09
Сыворотка 7	Fe	$(3,8 \pm 0,3) \times 10^{-6}$ моль/л	0,06	$(3,6 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ моль/л*	0,09	1,13	1,8
	Cu	$(3,5 \pm 0,2) \times 10^{-5}$ моль/л	0,05	$(3,3 \pm 0,3) \times 10^{-5}$ моль/л*	0,07	1,59	2,3

* - атомно-абсорбционная спектроскопия; ♦ - инверсионная вольтамперометрия; • - спектрофотометрия

Таблица 8

Влияние матричных компонентов на результаты определения 2×10^{-5} моль/л ионов **Fe(III)** с помощью амперометрического ДНК-содержащего БС ($n=5, P=0.95$)

Соотношение Fe(III) : М	Найдено, $(\bar{c} \pm \delta) \times 10^3$, моль/л	s_r
1 : 1 М = Mg(II), Zn(II), Cu(II), Al(III)	2,1±0,3	0,12
1 : 5 М = Mg(II), Zn(II), Cu(II)	1,8±0,5	0,22
1 : 10 М = Mg(II), Zn(II)	1,9±0,4	0,17
1:100 М = Mg(II)	2,3±0,6	0,21

Данные табл. 9 свидетельствуют об отсутствии значимых систематических погрешностей в разработанной методике ($a < t_{0,95,8} \cdot s_a$; $b-1 < t_{0,95,8} \cdot s_b$).

Таблица 9.

Оценка систематической погрешности при определении **Pt(II)** в сыворотке крови ($n = 5, P = 0,95$)

Образцы сыворотки крови	$(\bar{c} \pm \delta)$, мг/л	A	b-1	$t_{0,95,8} \cdot s_a$	$t_{0,95,8} \cdot s_b$
1	0,14 ± 0,02	0,050	0,070	0,09	0,08
2	0,28 ± 0,05	0,060	0,100	0,065	0,148
3	0,06 ± 0,01	0,005	0,030	0,013	0,032

Аймалин в сыворотке крови и фармпрепаратах. Для оценки аналитических возможностей разработанных БАМ на основе амперометрического н-ДНК-содержащего БС и тест-системы с использованием модифицированной НЦ мембраны для определения низкомолекулярных БАВ - алкалоидов проведено определение аймалина в образцах сыворотки крови и в фармпрепаратах в присутствии компонентов лекарственных форм с целью контроля состава готовой продукции.

Некоторые результаты представлены в табл. 10 и 11. Из данных табл.10 следует, что расхождения между средними величинами концентраций аймалина, найденных двумя независимыми методами, незначимы и хорошо согласуются по t- и F-критериям.

Была проведена оценка мешающего влияния на результаты определения аймалина в фармпрепаратах присутствующих в таблетке других компонентов: талька, крахмала, глюкозы. Влияние компонентов лекарственной формы считалось мешающим, если получаемый аналитический

сигнал отличался от такового для чистого аймалина более, чем на $\pm 2\%$ для $n=5$. В результате установлено, что тальк, крахмал и глюкоза не влияют на определение концентраций аймалина, соответствующих его содержанию в фармпрепарате.

Таблица 10

Определение аймалина в модельных растворах сыворотки крови с помощью БАМ на основе амперометрического н-ДНК-содержащего БС и спектрофотометрической тест-системы с использованием модифицированной НЦ мембраны ($n=5$, $P=0,95$, $t_{\text{табл}}=2,78$; $F_{\text{табл}}=6,39$)

Введено аймалина, мкг/мл	Амперометрический н-ДНК содержащий БС		Спектрофотометрическая тест-система на НЦ мембране		$t_{\text{расч}}$	$F_{\text{расч}}$
	Найдено, $\bar{c} \pm \delta$, мкг/мл	s_r	Найдено, $\bar{c} \pm \delta$, мкг/мл	s_r		
0,40	0,42 \pm 0,06	0,12	0,43 \pm 0,04	0,08	0,71	2,25
0,75	0,72 \pm 0,08	0,09	0,77 \pm 0,07	0,07	2,08	1,31
1,00	0,95 \pm 0,08	0,07	0,97 \pm 0,07	0,06	0,81	1,38

Таблица 11

Результаты определения аймалина в лекарственных формах с помощью БАМ на основе амперометрического н-ДНК-содержащего БС и спектрофотометрической тест-системы на НЦ мембране ($n=5$, $P=0,95$, $t_{\text{табл}}=2,78$; $F_{\text{табл}}=6,39$)

Лекарственная форма	Аттестованное количество (по НД)	Найдено, $\bar{c} \pm \delta$	s_r	$t_{\text{расч}}$	$F_{\text{расч}}$
Амперометрический н-ДНК содержащий БС					
Аймалин, таблетки	50 \pm 4 мг/табл	48 \pm 6 мг/табл	0,10	0,93	2,25
Аймалин, инъекции	25 \pm 1 мг/мл	23 \pm 2 мг/мл	0,07	2,77	3,97
Спектрофотометрическая тест-система на НЦ мембране					
Аймалин, таблетки	50 \pm 4 мг/табл	44 \pm 8 мг/табл	0,15	2,07	4,09
Аймалин, инъекции	25 \pm 1 мг/мл	26 \pm 2 мг/мл	0,06	1,38	3,97

Из данных табл. 11 следует, что результаты двух разработанных способов определения аймалина равнозначны ($F_{\text{расч}} < F_{\text{табл}}$). Сравнением со стандартными образцами лекарственных препаратов установлено, что сис-

тематическая погрешность незначима ($t_{расч} < t_{табл}$). Важно отметить, что разработанные БАМ могут быть модифицированы для определения других гаптенов (низкомолекулярных АГ) и интеркаляторов ДНК, без изменения принципиальной основы данных методов.

Таким образом, разработанные специфичные, чувствительные БАМ на основе амперометрических ДНК-содержащих БС и спектрофотометрической тест-системы могут быть с успехом применены в условиях клинических лабораторий, лабораторий санэпидемстанций и центров контроля качества лекарственных средств для определения низкомолекулярных БАВ - металлов и фармпрепаратов, причем используемый принцип биоаффинного распознавания ДНК-эффиктор в сочетании с высокой чувствительностью позволяют оценить мутагенную и канцерогенную опасность данных потенциально генотоксичных агентов, в отличие от других физико-химических методов анализа и ферментных сенсоров.

Методы на основе амперометрических БС и спектрофотометрической тест-системы для определения высокомолекулярных эффикторов ДНК аутоАТ и диагностики аутоиммунных заболеваний. Разработанные БАМ определения высокомолекулярных БАВ - аутоАТ к ДНК - использованы для создания методов диагностики аутоиммунных заболеваний. В качестве примера они использованы для диагностики одного из аутоиммунных заболеваний животных — АБН. Патогенез алеутской болезни включает кроме инфекционного аутоиммунный цикл, в результате которого происходит выработка аутоАТ к собственной ДНК организма в результате повреждения лизосом и развивается гипергаммаглобулинемия. АБН приводит к потере массы тела животного и смерти, что приносит большой экономический урон. Эффективные методы лечения этой болезни пока не разработаны. Существующие методы диагностики (йодноагглютинационный тест, реакция иммуноэлектроосмофореза (РИЭОФ), ИФА со спектрофотометрической индикацией) неспецифичны (выявляют лишь 16-50% инфицированных норок), малочувствительны (выявляют лишь прогрессирующую форму заболевания), включают много операций, трудоемки и поэтому не получили широкого распространения. Необходима разработка простых, экспрессных и чувствительных методов диагностики болезни, учитывающих аутоиммунную природу заболевания.

Диагностика АБН с помощью ДНК-содержащего ИФС. Диагностику с помощью БАМ на основе ИФС, полученного соиммобилизацией ДНК и ХЭ (см. раздел 4) проводят по разности I_n при $-0,55$ В в отсутствие и в присутствии анализируемой сыворотки крови животных. Эта разность должна составлять не менее $(2 - 3)s$, где s — стандартное отклонение высот пиков при этом же потенциале в присутствии сыворотки здоровых животных (нулевого стандарта). Стандартное отклонение в условиях нашего опыта составило $0,043$ мкА при $n=5$. Результаты определений представлены по положительно-отрицательному методу. Некоторые результаты представлены в табл.12.

Диагностика АБН методом ИФА со спектрофотометрической индикацией и с помощью амперометрического ИФС*

I_n (мкА)	A при 492 нм	Результат диагностики	
		ИФС	ИФА
1,8	0,414	+	+
0,9	0,423	+	+
2,0	0,010	-	-
1,0	0,344	+	+
1,9	0,034	-	-

*Для ИФС: $I_p^0 = 2,0$ мкА (I_p в отсутствие специфических АТ), $3 \times s = 0,13$ мкА; для ИФА: $A^0 = 0,035$ (поглощение раствора конъюгата + раствора сыворотки здоровых животных или неспецифической сыворотки), $3 \times s = 0,105$.

Из 31 обследованной норки обнаружено 8 больных алеутской болезнью. Результаты диагностики заболеваний, полученные с помощью ИФС, хорошо согласуются с результатами классического ИФА с использованием ДНК со спектрофотометрической индикацией и с данными РИЭОФ (см. табл. 12, 13). Однако предлагаемый нами вариант БАМ с помощью ИФС выгодно отличается от существующих способов простотой и экспрессностью.

Спад I_n при $-0,55$ В в присутствии IgG человека и крупного рогатого скота менее, чем на $3s$ (0,05 и 0,095) указывает на селективность действия ИФС. Это еще раз подтверждает отсутствие неспецифической сорбции белков на модифицированной НЦ мембране после обработки БСА, кинетические условия эксперимента, достигаемые перемешиванием, также уменьшают неспецифическую сорбцию.

Таблица 13

Сравнительная оценка результатов диагностики АБН с помощью ИФС, ИФА и РИЭОФ

Параметры оценки	Уравнение	Величина параметра, %		
		ИФС _{ДНК}	ИФА _{ДНК}	РИЭОФ
Правильность	$\frac{ИП \times 100}{ИП + ЛО}$	72,2	100,0	50,0
Специфичность	$\frac{ИО \times 100}{ИО + ЛП}$	100,0	93,7	98,0
Эффективность	$\frac{(ИП + ИО) \times 100}{(ИП + ЛП) + (ИО + ЛО)}$	91,2	95,0	89,0

ИП - истинно-положительный
ЛП - ложно-положительный

ИО - истинно-отрицательный
ЛО - ложно-отрицательный

Диагностика АБН с помощью ИФАМ с участием ДНК. При проведении диагностики АБН с помощью ингибиторного ИФАМ чувствительность анализа достигается за счет метода амперометрической детекции и высокой чувствительности ферментативной реакции с участием ХЭ к присутствию ингибиторов. Используемый принцип стерического экранирования позволяет упростить анализ за счет отсутствия необходимости разделения связанных и несвязанных с ДНК антител. При диагностике, основанной на разработанном БАМ (см. раздел 4) норка считается больной если I_n при - 0,55 В для исследуемой сыворотки более, чем на 3s превышает I_n для сыворотки здоровых животных, но не превышает контрольного сигнала ($3s = 0,10$ мкА для $n = 5$). Результаты диагностики АБН, полученные на основе разработанного ИФАМ, хорошо согласуются с результатами классического ИФА со спектрофотометрическим окончанием, но предлагаемый метод также отличается отсутствием многостадийности, простотой; работа при перемешивании в кинетическом режиме позволяет сократить продолжительность анализа от нескольких часов до 30 мин при проведении серийной диагностики (для последующих определений отсутствует необходимость в получении контрольного сигнала и сигнала в присутствии сыворотки здоровых норок).

Диагностика АБН с помощью БАМ на основе амперометрического ДНК-содержащего БС. Диагностику с помощью БАМ на основе амперометрического ДНК-содержащего БС и комплекса Pt(II) в качестве метки ДНК или АТ с использованием пиков КТВВ при -1,2 и -1,4 В (см. раздел 4)

Таблица 14

Диагностика АБН с помощью БАМ на основе амперометрического ДНК-содержащего БС* и ИФА со спектрофотометрической регистрацией**

I_n при -1,2В,мкА	I_n при -1,4В,мкА	\bar{c}_{AT} , моль/л	A при 492 нм	результаты диагностики, (n=5)	
				БС	ИФА
14,9	-	$5,1 \times 10^{-10}$	0,085	-	-
14,8	-	$5,2 \times 10^{-10}$	0,105	-	-
14,3	-	$5,5 \times 10^{-10}$	0,145	+	+
12,5	-	$7,0 \times 10^{-10}$	0,153	+	+
8,5	-	$1,0 \times 10^{-9}$	0,187	+	+
-	12,0	$3,4 \times 10^{-8}$	0,205	+	+
-	17,0	$5,0 \times 10^{-8}$	0,245	+	+

I_n^0 (при -1,2 В) = 15,0 мкА, 3s = 0,63 мкА; I_n^0 (при -1,4 В) = 20,0 мкА, 3s = 0,96 мкА, где I_n^0 ток пика для сыворотки крови здоровых животных или неспецифической сыворотки.

** $A_0 = 0,025$, 3s = 0,115, где A_0 оптическая плотность для сыворотки крови здоровых животных или неспецифической сыворотки.

проводили, исходя из 3s критерия, т.е. животное считается больным если разница между высотами пиков в присутствии и в отсутствии анализируемой сыворотки крови не меньше 3s. В данном случае для пика при -1,2 В $s = 0,21$ мкА, а для пика при -1,4В $s = 0,32$ мкА ($n = 5$). Из 20 обследованных норок обнаружено 5 больных алеутской болезнью (табл. 14).

Для оценки правильности разработанного метода диагностики результаты, полученные с помощью ДНК-содержащего БС, сопоставлены с данными классического ИФА со спектрофотометрической индикацией и хорошо согласуются друг с другом. При оценке специфичности диагностики установлено, что уменьшение высоты пика при -1,2 В составляет только 0,45 мкА в присутствии 10-кратного избытка IgG кролика и 0,38 мкА в присутствии 30-кратного избытка IgG крупного рогатого скота, что составляет менее 3s. Результаты определения специфических аутоАТ к ДНК с помощью ДНК-содержащего БС в присутствии различных количеств IgG кролика и IgG крупного рогатого скота с использованием градуировочного графика для пика при -1,2 В представлены в табл.15. Установлено, что отклонение между введенным и найденным количествами аутоАТ незначительно в области определяемых концентраций ($t_{расч} < t_{табл}$). Систематическая ошибка незначительна даже 10-кратном избытке IgG, неспецифических к ДНК. S_г не превышает 11% и практически не зависит от соотношения между аутоАТ и IgG кролика или крупного рогатого скота в образце.

Таблица 15

Результаты определения специфических аутоАТ в присутствии IgG кролика и крупного рогатого скота с использованием амперометрического ДНК-содержащего БС ($n = 5$, $P = 0,95$, $t_{табл} = 2,78$)

Соотношение ауто-АТ : неспециф. IgG	Введено аутоАТ, моль/л	Найдено аутоАТ, моль/л	s_r	$t_{расч}$
В присутствии IgG кролика				
1:1	$5,0 \times 10^{-10}$	$(5,2 \pm 0,4) \times 10^{-10}$	0,06	1,39
	$6,0 \times 10^{-9}$	$(6,3 \pm 0,4) \times 10^{-9}$	0,05	2,08
1:5	$6,0 \times 10^{-10}$	$(6,3 \pm 0,7) \times 10^{-10}$	0,09	1,18
	$1,0 \times 10^{-9}$	$(0,97 \pm 0,08) \times 10^{-9}$	0,06	1,15
1:10	$7,0 \times 10^{-10}$	$(7,4 \pm 0,9) \times 10^{-10}$	0,10	1,21
	$5,5 \times 10^{-9}$	$(5,7 \pm 0,4) \times 10^{-9}$	0,06	1,31
В присутствии IgG крупного рогатого скота				
1:1	$7,5 \times 10^{-10}$	$(7,8 \pm 0,8) \times 10^{-10}$	0,08	1,04
	$8,0 \times 10^{-9}$	$(7,6 \pm 0,6) \times 10^{-9}$	0,06	1,85
1:5	$5,0 \times 10^{-10}$	$(4,7 \pm 0,4) \times 10^{-10}$	0,07	2,08
	$2,0 \times 10^{-9}$	$(2,2 \pm 0,3) \times 10^{-9}$	0,11	1,85
1:10	$9,0 \times 10^{-10}$	$(8,5 \pm 0,9) \times 10^{-10}$	0,09	1,54
	$3,0 \times 10^{-9}$	$(3,3 \pm 0,4) \times 10^{-9}$	0,10	2,08

Диагностика АБН с помощью БАМ с использованием иммуноферментной тест-системы на основе НЦ мембраны, модифицированной ДНК. Метод диагностики АБН, разработанный на основе предложенного БАМ, использующего иммуноферментную тест-систему со спектрофотометрической регистрацией на основе готовой НЦ мембраны, модифицированной ДНК (см. раздел 7), основан также на $3s$ критерии. В данном случае норма считается большой, если ΔA превышает среднее значение $\Delta A_0 = A_0 - A_{\text{фона}}$ (где A_0 - значение оптической плотности для сыворотки крови здоровых животных или неспецифической сыворотки, $A_{\text{фона}}$ - оптическая плотность фона, т.е. НЦ мембраны, модифицированной ДНК, после выдерживания в растворе субстрата) более, чем на $3s$, величина $3s$ составила 0,018 при $n = 5$. Проведена сравнительная диагностика АБН методом гетерогенного ИФА на планшете и на модифицированной НЦ мембране (табл. 16). В табл. 16 представлены полученные при диагностике на НЦ значения ΔA при 370 нм и рассчитанные из них с помощью корреляционного уравнения (см. раздел 7) концентрации АТ. Результаты определений представлены также по положительно-отрицательному методу. Результаты диагностики, полученные с помощью тест-системы на НЦ мембране, модифицированной ДНК, хорошо согласуются с результатами ИФА на полистирольном планшете, однако продолжительность анализа сокращается от 4 ч и более до 30 мин.

Таблица 16.

Диагностика АБН методом ИФА на планшете* и с помощью тест-системы на модифицированной НЦ мембране**

ΔA при 370 нм (мембрана)	c_{AT} , моль/л	A при 492 нм (планшет)	Результаты диагностики ($n = 5$)	
			планшет	мембрана
0,106	$1,03 \times 10^{-6}$	0,245	+	+
0,071	$2,42 \times 10^{-7}$	0,285	+	+
0,151	$3,89 \times 10^{-6}$	0,423	+	+
0,038	$2,76 \times 10^{-8}$	0,010	-	-
0,048	$6,16 \times 10^{-8}$	0,105	-	-
0,074	$2,80 \times 10^{-7}$	0,344	+	+
0,032	$1,54 \times 10^{-8}$	0,034	-	-
0,252	$3,18 \times 10^{-5}$	0,511	+	+
0,196	$1,10 \times 10^{-5}$	0,436	+	+
0,169	$6,09 \times 10^{-6}$	0,361	+	+

* $A_0 = 0,035$; $3s = 0,105$, где A_0 - оптическая плотность для сыворотки крови здоровых животных или неспецифической сыворотки; ** $\Delta A_0 = 0,038$; $3s = 0,018$, где $\Delta A_0 = A_0 - A_{\text{фона}}$; $A_{\text{фона}}$ - оптическая плотность фона.

Специфичность анализа подтверждается отсутствием отклика на иммуноглобулины крупного рогатого скота, кролика и свиньи, а именно, значения ΔA составляют 0,038; 0,048 и 0,05, соответственно, что меньше, чем $\Delta A_0 + 3s = 0,056$. Этот факт свидетельствует, что конъюгат вторичных антител, меченных ПХ, не дает неспецифического связывания в условиях иммунореакции и не сорбируется на мембране.

На основе БАМ, использующего иммуноферментную тест-систему со спектрофотометрической регистрацией, предложен вариант визуальной оценки результатов диагностики, поскольку интенсивности цветowych пятен для сыворотки крови больных животных и для сыворотки крови здоровых животных или неспецифической сыворотки резко отличаются (интенсивно коричневое и практически бесцветное, совпадающее по цвету с фоном, пятно, соответственно). Следует отметить, что это различие в интенсивности сохраняется несколько лет, что позволяет использовать высушенные после проведения анализа мембраны для протоколирования результатов тестирования.

В результате, разработанный метод диагностики на основе тест-системы и визуальной оценки результатов настолько прост, экспрессен, не требует специальной квалификации персонала и дорогостоящего оборудования, высокоселективен и высокочувствителен, что был испытан и внедрен в различных звероводческих хозяйствах Татарстана и России для проведения массовой диагностики АБН (акты производственных испытаний прилагаются). Созданные готовые диагностикумы на основе разработанной тест-системы были представлены на международной выставке биопрепаратов (г.Казань, ГИДУВ, 1992 год).

Следует отметить, что разработанный метод модификации НЦ мембран и БАМ на их основе может быть использован для определения любых ауто-АТ и, следовательно, для диагностики ряда аутоиммунных заболеваний. Кроме того, данный метод может быть использован для любой пары антиген - антитело, а также для определения различных антител в одном образце сыворотки крови, что имеет большое значение для дальнейшего совершенствования клинического анализа.

Таким образом, разработанные БАМ определения высокомолекулярных эффекторов ДНК позволяют с высокой специфичностью и чувствительностью определять антитела к ДНК, вырабатываемые при аутоиммунных заболеваниях человека и животных, в условиях клинических лабораторий и лабораторий ветеринарного контроля. Данные БАМ позволяют также проводить дифференциальную диагностику системных аутоиммунных заболеваний человека и животных, в том числе на ранних стадиях. Применение этих методов для исследования содержания АТ к ДНК в сыворотке крови здоровых людей может позволить установить их уровень в норме и определить критерии для выявления лиц, относящихся к группе риска по системным аутоиммунным заболеваниям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе показана возможность высокоспецифичного и чувствительного определения низко- и высокомолекулярных БАВ в сложных многокомпонентных системах с помощью разработанных электрохимических и спектрофотометрических БАМ на основе взаимодействия биоаналитических реагентов - биолигандов (ДНК, АТ, АТ, ферментов) с их эффекторами. На основании всего объема проведенных исследований в области разработки БАМ, в том числе с использованием ДНК-содержащих биосенсоров, проведена систематизация подходов к созданию таких сенсоров, которая позволяет оптимизировать усилия по дальнейшим разработкам биосенсоров, сделать их более целенаправленными, и получить ДНК-содержащие биосенсоры с наилучшими операционными характеристиками, позволяющие решать широкий спектр современных аналитических задач.

Алгоритм создания и использования ДНК-содержащего БС.

1. Оценка объекта анализа
 - 1.1 Оценить примерное содержание в нем определяемого вещества (аналита)
 - 1.2 Выяснить характер взаимодействия аналита с ДНК (интеркалятор, алкилирующий агент, окислитель, и т.д.)
2. Выбор формы ДНК для иммобилизации
 - 2.1. Учесть характер взаимодействия аналита с ДНК
 - 2.2. Изучить процесс комплексообразования аналита с ДНК.
 - 2.3. Подобрать оптимальные рабочие условия регистрации взаимодействия ДНК-аналит
3. Выбор трансдьюсера
 - 3.1. Учесть характер сигнала и подобрать способ его количественной оценки
 - 3.2. Учесть диапазон определяемых концентраций аналита и необходимую чувствительность детекции
 - 3.3. Учесть требования аналитической задачи
 - 3.3.1. Стационарный анализ или в анализ потоке
 - 3.3.2. Выбрать между одноразовым и многоразовым трансдьюсером
 - 3.3.3. Оценить необходимость миниатюризации трансдьюсера
4. Выбор способа иммобилизации
 - 4.1. Выбрать время, условия адсорбции и состав исходного раствора при физической иммобилизации
 - 4.2. Выбрать модификатор, время и условия взаимодействия с ДНК и с трансдьюсером (матрицей - носителем ДНК) при ковалентной иммобилизации
 - 4.3. Оптимизировать состав биочувствительного слоя (раствора) для измерения
 - 4.3.1. Оценить необходимость использования переносчика
 - 4.3.2. Оценить необходимость соиммобилизации метки
5. Выбор системы усиления биосигнала при взаимодействии ДНК с

аналитом

- 5.1. Использовать ферментативное усиление
- 5.2. Использовать модулятор активности фермента (ингибитор, активатор)
- 5.3. Использовать систему авидин (стрептавидин) биотин
- 5.4. Использовать в качестве метки металл или его комплекс
6. Оценка операционных характеристик БС
 - 6.1. Установить наличие вымываемости ДНК или метки в случае соиммобилизации в процессе работы и при хранении
 - 6.2. Оценить биологическую активность ДНК после иммобилизации и при хранении
 - 6.3. Оценить стабильность работы БС при интенсивном использовании. Установить число рабочих циклов
 - 6.4. Выбрать условия хранения БС
 - 6.5. Оценить стабильность работы БС при хранении
7. Подбор рабочих условий проведения анализа
 - 7.1. Выбрать рН
 - 7.2. Выбрать между кинетическим или диффузионным режимом в зависимости от устойчивости комплекса ДНК-эффектор
 - 7.3. Определить минимально необходимую продолжительность этапов анализа
 - 7.4. Исключить неспецифическое взаимодействие с трансдьюсером и ДНК-содержащей биочувствительной частью
8. Построение градуировочного графика
9. Оценка метрологических характеристик, чувствительности детекции, чувствительности и воспроизводимости анализа
10. Оценка влияния матричных компонентов анализируемой системы
11. Адаптация метода пробоподготовки или доказательство отсутствия ее необходимости
12. Доказательство специфичности анализа (введение некомплементарных олигонуклеотидов в случае гибридизации ДНК, введение интеркаляторов или алкилирующих агентов со сходной с аналитом структурой и т.д.)
13. При отсутствии индивидуальной специфичности доказать наличие групповой специфичности анализа
14. Сравнение результатов анализа с помощью ДНК-сенсора с результатами независимых методов

ВЫВОДЫ

1. Сформулированы научно-методические подходы к разработке и применению биоаффинных способов определения низко- и высокомолекулярных эффекторов ДНК и других биологически активных веществ на основе биосенсоров и тест-систем. Показана перспективность использования разработанных биоаффинных методов при анализе многокомпонентных систем, при диагностике заболеваний и экомониторинге.

2. Разработаны общие подходы, позволяющие оценить количественные параметры взаимодействия тяжелых металлов с ДНК. Обоснован вы-

бор денатурированной ДНК для иммобилизации в составе нитроцеллюлозной мембраны как универсального биоспецифического аналитического реагента в биоаффинных методах. Доказана наибольшая эффективность использования иммобилизованной денатурированной ДНК для моделирования ее взаимодействия с эффекторами: тяжелыми металлами, платиносодержащими противоопухолевыми препаратами, аутоантителами, и для создания ДНК-содержащих биосенсоров, тест-систем; установленные соотношения нуклеотид-металл в комплексах, доли их накопления в растворе и константы устойчивости для данной формы ДНК максимальны.

3. Выявлена роль адсорбции тяжелых металлов (из индивидуальных растворов и при совместном присутствии) на модифицированной мембране в формировании аналитического сигнала ДНК-содержащего биосенсора. Высокие значения констант устойчивости комплексов металл - иммобилизованная денатурированная ДНК свидетельствуют о специфичности их взаимодействия. Показана возможность селективного определения тяжелых металлов в многокомпонентных био- и экосистемах до $p \times 10^{-11}$ моль/л с помощью биоспецифического мембранного концентрирования на биосенсоре. Найдены рабочие условия функционирования и реактивации биосенсора для его многократного использования в зависимости от природы эффекторов ДНК.

4. Разработан биоаффинный метод определения низкомолекулярных эффекторов ДНК - противоопухолевых лекарственных препаратов на основе комплексов платины цисплатина и оксоплатина по каталитическим токам выделения водорода, возникающих при комплексообразовании платины с денатурированной ДНК в составе биосенсора с нижней границей определяемых содержаний (c_n) фармпрепаратов $5,0 \times 10^{-9}$ моль/л для цисплатина и $6,0 \times 10^{-10}$ моль/л для оксоплатина.

5. Расширены аналитические возможности ДНК-содержащего биосенсора при определении высокомолекулярных эффекторов ДНК - аутоантител к ДНК с использованием комплекса Pt(II) в качестве метки ДНК или аутоантител. Установлена неоднородность популяции аутоантител к ДНК и определены значения аффинных констант связывания в системе ДНК - аутоантитело, которые составляют $(1,25 \pm 0,02) \times 10^9$ и $(2,50 \pm 0,03) \times 10^8$ моль⁻¹, что свидетельствует о высокой специфичности аутоантител к ДНК.

6. Обоснован принцип действия и аналитические возможности биоаффинного мембранного концентрирования интеркаляторов ДНК на примере определения индольного алкалоида аймалина в сыворотке крови и фармпрепаратах с применением биосенсора на основе стеклоуглеродного электрода и нативной ДНК, иммобилизованной в нитроцеллюлозной мембране.

7. Показаны перспективы повышения чувствительности, селективности и экспрессности иммуноанализа сыворотки крови с вольтамперометрической регистрацией при использовании различных систем биоаффинного распознавания, каталитического усиления сигнала и применения новых способов иммобилизации биомолекул на ряде примеров определения

аутоантител к ДНК: с помощью ферментного сенсора на основе холинэстеразы и синтезированного конъюгата ДНК с ингибитором холинэстеразы хлорофосом ($c_n = 2,0 \times 10^{-8}$ моль/л); с помощью иммуноферментного сенсора на основе соиммобилизации ДНК и холинэстеразы ($c_n = 5,0 \times 10^{-11}$ моль/л).

8. Созданы биоаффинные иммуноферментные тест-системы для массового экспресс-анализа низко- и высокомолекулярных биологически активных веществ (на примере аймалина и аутоантител к ДНК) на готовых нитроцеллюлозных мембранах, модифицированных ковалентно связанными компонентами биовзаимодействия, со спектрофотометрической и визуальной регистрацией сигнала с использованием его ферментативного усиления. Достоинством предложенных тест-систем являются простота в использовании, отсутствие дополнительной пробоподготовки, экономичность, высокая специфичность, пригодность для качественной оценки и протоколирования результатов анализа.

9. Разработан амперометрический иммуносенсор на основе аутоантител и комплекса Pt(II) в качестве м ($c_n = 0,5$ мкг/мл) для определения денатурированной ДНК. Амперометрический ДНК-зонд с новым биодетектирующим слоем с ковалентно иммобилизованными олигонуклеотидами в нитроцеллюлозной мембране на поверхности стеклоуглеродного электрода предложен для изучения процесса гибридизации ДНК и определения последовательности нуклеотидов. Биоаффинный метод с ферментативным усилением сигнала при образовании комплементарного комплекса с применением в качестве метки щелочной фосфатазы и системы биотинстрептавидин обеспечивают высокую чувствительность, селективность и возможность определения повреждений структуры ДНК под действием различных эффикторов.

Основное содержание диссертационной работы изложено в следующих публикациях

1. А.с. 1707522 СССР, МКИ G01N27/333. Ферментный электрод для иммуноферментного анализа/ Э.П.Медянцева, С.С.Бабкина, Г.К.Будников, И.Л.Федорова, Н.Н.Ибрагимова, В.Х.Винтер, Г.Ю.Бочкарев; Казанский гос.университет.-№4766894/25; Заявл. 05.07.89; Опубл.1992. Бюл.№3
2. А.с. 1822971 СССР МКИ 3 G01N27/48. Способ определения микроколичеств тяжелых металлов/ Э.П.Медянцева, С.С.Бабкина, Г.К.Будников, И.Л.Федорова, М.Г.Вертлиб; Казанский гос.университет. - №4839153/25; Заявлено 14.06.90; Опубл.1993, Бюл.№23.
3. А.с. 1832198 СССР МКН5G01N33/53. Способ определения антител в сыворотке крови/С.С.Бабкина, Э.П.Медянцева, Г.К.Будников, М.Г.Вертлиб, Н.Н.Ибрагимова, В.Г.Винтер; Казанский гос.университет. - №4902268/14; Заявлено 14.01.91; Опубл.1993, Бюл.№29.

4. Пат. 2088230 РФ. МКИ 6 А 61 К 31/475, 39/385. Способ получения конъюгата аймалина с бычьим сывороточным альбумином/ С.С.Бабкина, В.Г.Винтер, А.С.Зайнуллина; Казанский гос.университет. - №93039016/14; Заявл. 27.07.93; Опубл. 27.08.97.

5. Будников Г.К. Амперометрические датчики на основе иммобилизованных ферментов/ Г.К.Будников, Э.П.Медянцева, С.С.Бабкина // Успехи химии. - 1991. - Т.60, №4. - С.881-910.

6. Budnikov H.C. An enzyme amperometric sensor for toxicant determination/ H.C.Budnikov, E.P.Medyantseva, S.S.Babkina // J.Electroanal.Chem. -1991.-V.310.- P.49-55.

7. Babkina S.S. An enzyme amperometric sensor for the determination of cholinesterase effectors/ S.S.Babkina, E.P.Medyantseva, H.C.Budnikov//Abs.4th Eur.Conf. on Electroanalysis. ESEAC92.- Noordwijkerhout, the Netherlands, 1992. - P.58.

8. Медянцева Э.П. Амперометрический иммуноферментный электрод на основе иммобилизованной холинэстеразы/ Э.П.Медянцева, С.С.Бабкина, Г.К.Будников, И.Л.Федорова, Н.Н. Ибрагимова.// Журн.аналит.химии. - 1992. - Т.47, № 6. - С. 1101-1106.

9. Babkina S. Various types of amperometric biochemical sensors for cholinesterase effectors determination/ S.Babkina, E.Medyantseva, G.Budnikov, M.Vertlib// Abs. Eur. Conf. "Euroanalysis VIII".- Edinborough. 1993.- P1 13.

10. Медянцева Э.П. Вольтамперометрический контроль иммунологических реакций/ Э.П.Медянцева, С.С.Бабкина, М.Г.Вертлиб, Г.К.Будников// Журн.аналит.химии. -1993. - Т.48, № 10. - С.1632-1638.

11. Babkina S.S. Enzyme amperometric sensor for the determination of cholinesterase inhibitors or activators./ S.S.Babkina, E.P.Medyantseva, H.C.Budnikov, V.G.Vinter // Analytica Chimica Acta. - 1993. - V.273. - P.419-424.

12. Бабкина С.С. Иммуноферментное определение антител к ДНК на нитратцеллюлозных мембранах/ С.С.Бабкина, В.Г.Винтер, А.С.Зайнуллина//Журн.аналит.химии. - 1994. - Т.49, № 12. - С.1313-1316.

13. Бабкина С.С. Иммуноферментный метод определения низкомолекулярных органических соединений со спектрофотометрической индикацией аналитического сигнала/ С.С.Бабкина, В.Г.Винтер, А.С.Зайнуллина// Журн.аналит.химии. - 1994. - Т.49, № 10. - С.1119-1123.

14. Budnikov H.C. Organophosphorus compounds in the environment and new chemical sensors for their analysis/ H.C.Budnikov, S.S.Babkina, I.L.Fedorova // Abs. 13th Int.conf.on phosphorus chemistry. ICPC- Jerusalem(Israel),1995.-P.151.

15. Медянцева Э.П. Амперометрический биохимический сенсор на основе иммобилизованной холинэстеразы в иммуноанализе пестицидов./ Э.П.Медянцева, М.Г.Вертлиб, Г.К.Будников, С.С.Бабкина, С.А.Еремин // Журн.аналит.химии. - 1995. - Т.50, №7. - С.782-786.

16. Babkina S.S. Enzyme immunoassay of autoantibodies: new variants based on DNA immobilization/ S.S.Babkina, E.P.Medyantseva, H.C.Budnikov

// Abs. A N.Y.Academy Conf. "B Lymphocytes and autoimmunity".- Prague. 1996.-P.I

17. Бабкина С.С., Исследование комплексообразования Pt(II) с денатурированной ДНК. / С.С.Бабкина, О.В.Климович, Н.А.Улахович // Структура и динамика молекулярных систем. Сборник статей. - Йошкар-Ола - Казань - Москва, 1996. - Ч.1.- С.43-46

18. Медянцева Э.П. Аналитические возможности амперометрических холинэстеразных биосенсоров в проточном анализе/ Э.П.Медянцева, С.С.Бабкина, Г.К.Будников // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов - 1996.- т.62, №2,- С.9-13.

19. Галиуллин А.К. Конструирование потенциалметрического сенсора для иммунологического анализа возбудителя сибирской язвы/ А.К.Галиуллин, Э.П.Медянцева, С.С.Бабкина // Ветеринария.- 1996.- №11.- С.30-32.

20. Babkina S.S. New variants of enzyme immunoassay of antibodies to DNA/ S.S. Babkina, E.P. Medyantseva, H.C. Budnikov, M.P. Tyshlek// Anal. Chem.-1996.- V. 68, № 21.-P. 3827-3831.

21. Babkina S.S. The use of DNA complexing metals in assay of anti-DNA antibodies with amperometric biosensors./ S.S.Babkina, N.A.Ulakhovich, E.P.Medyantseva // Abstr.of Intern. Congress of Analytical Chemistry.-Russia, Moscow, 1997.-V.1.-D-47.

22. Babkina S.S. New approach to the determination of DNA and antibodies to DNA using amperometric biosensors and Pt(II) complexing/ S.S.Babkina, N.A.Ulakhovich, E.P.Medyantseva, Yu.I.Zyavkina // Abstr. Giulio Milazzo school on bioelectrochemistry.-Hungary, Sjged, 1997.-P.2

23. Бабкина С.С. Вольтамперометрическое определение компонентов биоспецифического взаимодействия дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и антител к ней с образованием комплексов Pt(II)/С.С.Бабкина, Н.А.Улахович, Э.П.Медянцева, О.В Климович.//Журн.аналит.хим.-1998.-Т.53,№6.-С.604-607.

24. Бабкина С.С. Определение аутоантител к ДНК с помощью биосенсора на основе комплекса Pt(II) с ДНК/ С.С.Бабкина, Н.А.Улахович, Э.П.Медянцева, О.В Климович // Прикл.биохимия и микробиология. - 1998. - Т.34 №5. - С.572-575.

25. Babkina S.S. Voltammetric sensor based on mercury film-covered silver electrode and immobilized DNA and its use DNA effectors assay/ S.S.Babkina, N.A.Ulakhovich, Yu.A.Zyavkina // Abs. of International conf. «Modern Electroanalytical Methods».- Czech.Republic, Pardubice. 1999.-PO/45

26. Бабкина С.С. Вольтамперометрическое определение биологически-активных веществ на основе их комплексообразования с иммобилизованной ДНК/ С.С.Бабкина, Н.А.Улахович, Ю.И.Зявкина // V Всеросс. конфер. по электрохимическим методам анализа. ЭМА-99. Тез. Докл.- М., Наука, 1999.-С.7.

27. Улахович Н.А. Определение эффлекторов дезоксирибонуклеино-

вой кислоты с помощью биохимического амперометрического сенсора/ Н.А.Улахович, С.С.Бабкина, Ю.И.Зявкина // Российский химический журнал. Журн. РХО им. Д.И.Менделеева. - 1999. - Т.43, №3-4. - С.147-149.

28. Бабкина С.С. Амперометрический биосенсор на основе дезоксирибонуклеиновой кислоты и комплексов платины(II): новые аналитические возможности/ С.С.Бабкина, Н.А.Улахович, Э.П.Медянцева, Ю.И.Зявкина // Журн.аналит.хим. - 1999. - Т.54, № 11. - С.1205-1211.

29. Бабкина С.С. Амперометрический сенсор на основе дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) для определения эффекторов ДНК/ С.С.Бабкина, Н.А.Улахович, Ю.И.Зявкина, Е.Н.Моисеева// Международ. конференц. Сенсор-2000. Сенсоры и микросистемы. Тез.докл.-СПетербург, 2000.-С 123-124.

30. Бабкина С.С. Анализ содержания платины в фармпрепаратах и биообъектах с помощью амперометрического биосенсора на основе дезоксирибонуклеиновой кислоты/ С.С.Бабкина, Н.А.Улахович, Ю.И.Зявкина // Заводск. лаборатория. Диагностика материалов. - 2000.- Т. 66.№ 12.- С. 147 -149.

31. Babkina S.S. Amperometric biochemical sensor based on immobilized deoxyribonucleic acid (DNA): A new tool for ecological monitoring/ S.S.Babkina, N.A.Ulakhovich, E.P.Medyantseva, Yu.A.Zyavkina // Ecological Congress.- 2000.- V.3. No.2.- P.37-42.

32. Бабкина С.С. Контроль содержания тяжелых металлов в воде и продуктах питания путем их концентрирования на биосенсоре, содержащем дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) С.С.Бабкина, Н.А.Улахович, Е.Н.Моисеева, Е.Е.Филошина // Материалы и тез. докладов региональной научной конференции «Методы аналитического контроля материалов и объектов окружающей среды».- Пермь, Изд-во Пермского университета, 2001.-С. 120.

33. Бабкина С.С. Определение констант связывания в системе М(II)-ДНК как критерий оптимизации процесса определения тяжелых металлов в различных объектах с помощью биосенсора на основе ДНК/ С.С.Бабкина, Е.Н.Моисеева, Е.Е.Филошина, Н.А.Улахович /Тез.докл. Всерос.конф. «Актуальные проблемы аналит.химии».-Москва, 2002.-Т.2, с.166-167.

34. Бабкина С.С. Определение ионов тяжелых металлов и комплексов платины в сыворотке крови человека с помощью иммобилизованной дезоксирибонуклеиновой кислоты в составе биосенсора/ С.С.Бабкина, Н.А.Улахович, Е.Н.Моисеева, Ю.И.Зявкина, Е.Е.Филошина // Тез.докл. Междисциплинарной конференции с международным участием «Новые биокрибернетические и телемедицинские технологии 21-го века для диагностики и лечения заболеваний человека» НБИТТ-21.-Петрозаводск, 2002 -С 64.

35. Бабкина С.С. Определение ионов железа(III) в сыворотке крови с помощью иммобилизованной дезоксирибонуклеиновой кислоты в составе биосенсора/ С.С.Бабкина, Н.А.Улахович, Е.Н.Моисеева,

Е.Е.Филошина// 2я Российская научная конференция «Проблемы теоретической и экспериментальной аналитической химии». - Пермь, 2002.- С.86-87.

36. Babkina S.S. Amperometric biosensor based on denatured DNA for the study of heavy metals complexing with DNA and their determination in biological, water and food samples/ S.S.Babkina, N.A.Ulakhovich// Abs. XVII Intern.symp.bioelectrochem. bioenerg. - Florence, Italy, 2003. - P. 194.

37. Бабкина С.С. Адсорбция ионов свинца (II) и кадмия (II) на поверхности нитроцеллюлозной мембраны, модифицированной денатурированной дезоксирибонуклеиновой кислотой/ С.С.Бабкина, Н.А.Улахович, Ю.И.Зявкина, Е.Н.Моисеева//Журн.физ.химии. - 2003. - Т.77,№5. - С.890-894.

38. Бабкина С.С. Комплексообразование ионов меди (II) и железа(III) с дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК) и их определение с помощью ДНК-содержащего биосенсора/ С.С.Бабкина, Н.А.Улахович //XVII Менделеевский съезд по общ. и прикладн. химии. Тез.докл.Т.1.- Казань, 2003.-С.104.

39. Babkina S.S. Amperometric DNA biosensor for the determination of autoantibodies using DNA interaction with Pt(II) complex/ S.S.Babkina, N.A.Ulakhovich, Yu.I.Zyavkina // Analytica Chimica Acta. - 2004. - V.502, N.1.-P.23-30.

40. Babkina S. S Amperometric biosensor based on denatured DNA for the study of heavy metals complexing with DNA and their determination in biological, water and food samples/ S. S. Babkina, N. A. Ulakhovich // Bioelectrochemistry. - 2004.- V.63. - P.261-265.

41. Бабкина С.С. Определение констант связывания кадмия(II) и свинца(II) с дезоксирибонуклеиновой кислотой с помощью амперометрического сенсора/ С.С.Бабкина, Н.А.Улахович, Ю.И.Зявкина, Е.Н.Моисеева, Е.Е.Филошина, Е.В.Никитин, В.А.Загуменнов // Известия ВУЗов. Хим. и химтехнология.-2004. - Вып.8. - С.50-53.

42. Бабкина С.С. Использование комплексообразования ионов железа(III) с различными формами ДНК с целью разработки биосенсора для анализа сыворотки крови/ С.С.Бабкина, Н.А.Улахович // Биомедицинская химия.-2004.-Т.50, вып.6.-С.500-505.

43. Бабкина С.С. Электрохимические сенсоры на основе стационарных электродов и иммобилизованной ДНК либо ее фрагментов и оценка их аналитических возможностей/ С.С. Бабкина Э.Палечек, Ф.Йелен, М.Фойта // Тез.докл. VI Всеросс. конфер. по электрохимическим методам анализа. ЭМА-2004. - Уфа, 2004. - С.19-21.

44. Бабкина С.С. Изучение аналитических возможностей ДНК как реагента при разработке методов определения тяжелых металлов, противоопухолевых лекарственных препаратов и антител к ДНК/ С.С.Бабкина, Г.К.Будников //Тез.докл. Всеросс.конфер. по аналит.химии. «Аналитика России-2004».-Москва, 2004.- С. 184

Издательство «Экоцентр»
Лицензия Минпечати РТ № 0307 от 8.06.2000
Без объявл. — 2004

Отпечатано с готового оригинал-макета. Печать RISO.
Бумага офсет 1. Формат 60*84 1/16.
Объем 3,75 пл. Тираж 65 экз. Заказ 26.

Отпечатано на полиграфическом участке издательства «Экоцентр»
г. Казань, ул. Четаева, 18.

#24928