

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Химический факультет



ДОПУСТИТЬ К ЗАЩИТЕ В ГЭК
Руководитель ООП
Канд. хим. наук, доцент
В.В. Шелковников
« 13 » 06 2023 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА СПЕЦИАЛИСТА

РАЗРАБОТКА ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ АППАРАТОВ-СЕНСОРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
COVID-19 МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО-ИМПУЛЬСНОЙ
ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ

по специальности 04.05.01 Фундаментальная и прикладная химия
специализация «Фундаментальная и прикладная химия»

Прокопьева Вероника Алексеевна

Заведующий кафедрой аналитической
химии, канд. хим. наук, доцент

В.В. Шелковников
подпись

« 13 » 06 2023 г.

Руководитель ВКР

канд. хим. наук

Т.И. Изаак
подпись

« 13 » 06 2023 г.

Автор работы

студент группы № 081812

В.А. Прокопьева
подпись

« 13 » 06 2023 г.

В соответствии с п 3.2 «Регламента размещения текстов выпускных квалификационных работ в электронной библиотеке Научной библиотеки ТГУ» выпускная квалификационная работа специалиста Прокопьевой Вероники Алексеевны на тему «Разработка электрохимических аптасенсоров для диагностики COVID-19 методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии» размещается в репозитории с изъятием некоторых разделов в соответствии с решением правообладателя.

Руководитель ООП



В.В. Шелковников

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации.
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ТОМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ (НИ ТГУ)
Химический факультет



УТВЕРЖДАЮ

Руководитель ООП

Канд. хим. наук, доцент

В.В. Шелковников

02 2023 г.

ЗАДАНИЕ

по выполнению выпускной квалификационной работы специалиста обучающемуся
Прокопьевой Веронике Алексеевне

(Ф.И.О. обучающегося)

по направлению специальности 04.05.01 Фундаментальная и прикладная химия,
специализация «Фундаментальная и прикладная химия»

1 Тема выпускной квалификационной работы специалиста

Разработка электрохимических аптасенсоров для диагностики COVID-19 методом
дифференциально-импульсной вольтамперометрии.

2 Срок сдачи обучающимся выполненной выпускной квалификационной работы:

а) на рецензирование – 16.06.2023

б) в деканат – 19.06.2023

в) в ГЭК – 19.06.2023

3 Исходные данные к работе:

Объект исследования – аптасенсор на основе аптамера Apt31, специфичный к
шиповидному S-белку RBD-домена коронавируса.

Научная или прикладная
проблема – разработка новых экспрессных, достоверных,
экономически выгодных и доступных диагностических
средств обнаружения COVID-19.

Цель исследования – изучение возможности применения метода дифференциально-
импульсной вольтамперометрии для диагностики COVID-19 с
использованием аптасенсоров на основе аптамера Apt31.

Задачи:

- Изготовить аптасенсоры с аптамером, специфичным к S-белку RBD-домена;
- Охарактеризовать полученные аптасенсоры;
- Оценить влияние концентрации RBD и редокс-медиатора ГЦФ на регистрируемый электрохимический сигнал;
- Провести электрохимические измерения в присутствии искусственной модельной слюны;
- Провести электрохимические измерения в присутствии проб здоровых и больных COVID-19 кандидатов;
- Провести проверочный эксперимент с зашифрованными пробами;
- Определить возможно ли разделение между собой проб здоровых и больных кандидатов с применением выбранного метода.

Методы исследования:

- циклическая вольтамперометрия;
- дифференциально-импульсная вольтамперометрия.

Методы проверки достоверности результатов:

Статистическая обработка результатов по Q-критерию, t-критерию Стьюдента. Расчет абсолютной и относительной погрешности.

Ожидаемые результаты исследования:

Оценка возможности применения метода дифференциально-импульсной вольтамперометрии для обнаружения S-белка RBD-домена по человеческой слюне с использованием аптасенсоров на основе аптамера Apt31.

4. Этапы работы	Сроки
9.1 Отбор, анализ литературы, патентный поиск	18.02.2023 – 10.03.2023
9.2 Эксперимент и обсуждение результатов	10.03.2023 – 28.04.2023
9.3 Написание и оформление работы	01.05.2023 – 09.06.2023
9.4 Допуск к защите на кафедре	13.06.2023
9.5 Защита	22.06.2023

Руководитель выпускной квалификационной работы

О.В.Н. Дроздов кафедра биол. хим.
(должность, место работы)

[подпись]
(подпись)

Т.В. Цукан
(И.О. Фамилия)

Задание принял к исполнению

студент
(должность, место работы)

[подпись]
(подпись)

О.А. Романова
(И.О. Фамилия)

АННОТАЦИЯ

Дипломная работа посвящена разработке электрохимических аптасенсоров на основе аптамера Apt31 для диагностики COVID-19.

Объектом исследования являлся аптасенсор на основе аптамера Apt31, специфичный к шиповидному S-белку RBD-домена коронавируса (был разработан международной научной группой под руководством А.С. Кичкайло из ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск).

Основные методы, используемые в работе: циклическая вольтамперометрия, дифференциально-импульсная вольтамперометрия.

В рамках дипломной работы было изучено изменение электрохимического сигнала аптасенсора на основе аптамера Apt31 при связывании целевого S-белка RBD-домена, а также проведена апробация на реальных объектах. В качестве реальных объектов выступали смывы проб слюны после ПЦР-теста ковид-положительных и ковид-отрицательных кандидатов. Были сделаны выводы о потенциальной возможности применения аптасенсора на основе указанного аптамера для диагностики COVID-19 при регистрации электрохимического сигнала методом дифференциально-импульсной вольтамперометрии.

Представленная выпускная квалификационная работа изложена на 65 страницах, состоит из списка используемых обозначений и сокращений, введения, 3 разделов, заключения, списка использованных источников и литературы, приложения. Работа содержит 20 таблиц, 27 рисунков и 64 использованных источника и литературы.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 Обзор литературы	7
1.1 Коронавирусная инфекция COVID-19	7
1.1.1 Общая информация о коронавирусной инфекции COVID-19.....	7
1.1.2 Структура RBD-домена, связывающего рецептор SARS-CoV-2	8
1.2 Аптасенсоры	8
1.2.1 Общее понятие об аптамерах.....	8
1.2.2 Особенности строения аптамеров	9
1.2.3 Технология подбора аптамеров SELEX.....	10
1.2.4 Технология подбора аптамеров SIBDD.....	11
1.2.5 Использование аптасенсоров для диагностики SARS-CoV-2	13
1.2.6 Схема исследования аптасенсоров	14
1.3 Электрохимический анализ	18
1.4 Вольтамперометрические методы анализа	19
1.4.1 Нормальная импульсная ВА	20
1.4.2 Дифференциально-импульсная ВА	22
2 Материалы и методы	25
2.1 Приборы и оборудование	25
2.2 Реактивы.....	25
2.3 Методы, использованные для электрохимической обработки и измерений ...	25
2.4 Методики подготовки материалов	26
2.5 Методика подготовки электродов к нанесению аптамера	26
2.6 Схема и методика проведения измерений	27
2.7 Обработка полученных результатов	28
3 Результаты и обсуждение	30
3.1 Выбор методики химической обработки поверхности золотых электродов...	30
3.2 Создание воспроизводимого слоя аптамера Apt31 на поверхности электрода	32
3.3 Изучение способности иммобилизованного на электрод аптамера Apt31 связывать S-белок RBD-домена	32
3.4 Изучение влияния концентрации RBD на изменение электрохимического сигнала.....	32

3.5 Изучение влияния концентрации редокс-медиатора ГЦФ на изменение электрохимического сигнала.....	33
3.6 Эксперимент по изменению электрохимического сигнала в присутствии проб здоровых и больных COVID-19 кандидатов.....	37
3.7 Эксперимент по изменению электрохимического сигнала в присутствии искусственной слюны.....	37
3.8 Выбор параметра для разделения проб здоровых и больных кандидатов.....	37
3.9 Проверочный эксперимент с зашифрованными пробами.....	37
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	38
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ И ИСТОЧНИКОВ	40
ПРИЛОЖЕНИЕ А	46

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

Apt31 – аптамер в 31 нуклеотид, специфичный к S-белку RBD-домена

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ИФА – Иммуноферментный анализ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

РНК – рибонуклеиновая кислота

SELEX – Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment
(Систематическая эволюция лигандов при экспоненциальном обогащении)

SIBDD – Structure and Interaction Based Drug Design (Дизайн лекарств на основе структуры и взаимодействия)

ФИЦ КНЦ СО РАН – Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук»

SAM – self-assembled monolayer (самособирающийся монослой)

РКЭ – ртутный капающий электрод

ВА – вольтамперометрия

ЗЭ – золотой электрод

ЭХО – электрохимическая обработка

УЗВ – ультразвук

CV – Cyclic voltammetry (Циклическая вольтамперометрия)

ЦВА – Циклическая вольтамперометрия/вольтамперограмма

DPV – Differential pulse voltammetry (Дифференциальная импульсная вольтамперометрия)

ДИВА – Дифференциальная импульсная вольтамперометрия/вольтамперограмма

MPS – Multi-potential step

EIS – Electrochemical Impedance spectroscopy (спектроскопия электрохимического импеданса)

ГЦФ – гексацианоферраты (2,3) калия

PBS – phosphate buffered saline (натрий-фосфатный буферный раствор)

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19, вызванная распространением коронавируса (SARS-CoV-2), подтвердила высочайшую важность развития и усовершенствования эффективных и надежных методов обнаружения инфекций. По всему миру эта болезнь продолжает приносить жертвы, вызывает сбои в системах здравоохранения, экономике и социальной жизни. Стоит отметить, что быстрое создание вакцины против COVID-19 оказало огромное влияние на пандемию, помогая снизить госпитализацию и смертность [1-3]. Однако, вакцина не в состоянии полностью остановить распространение коронавируса, поэтому необходимо применять дополнительные меры для обнаружения и лечения болезни [4,5]. Эффективное и селективное выявление инфекции SARS-CoV-2 необходимо для мониторинга распространения болезни, а также для предотвращения передачи вируса [6,7].

Диагностика COVID-19 занимает центральное место в повседневной жизни, так как наличие отрицательного результата теста до сих пор часто является требованием для путешествий и доступа в общественные места. Поэтому так важно наличие способов быстрого и недорого обнаружения вируса [8]. Необходимы простые, экспрессные и экономически выгодные средства диагностики, которые будут дополнять или совсем заменят используемые на данный момент методы [9]. ПЦР-тест и иммуноанализ демонстрируют достаточную эффективность, однако, эти методы являются дорогостоящими, время затратными, а также требуют наличия специально обученного медицинского персонала [10,11].

Новые способы диагностики должны сочетать в себе экспрессность, высокую специфичность, чувствительность и простоту применения. Учитывая эти требования, электрохимические биосенсоры являются одним из лучших способов детектирования инфекций, так как чаще всего их можно легко встроить в диагностические устройства по месту оказания медицинской помощи [12].

Аптасенсоры – сенсоры на основе аптамеров, синтетических молекул ДНК и РНК, которые специфично распознают молекулу-мишень благодаря своей уникальной пространственной структуре. В рамках дипломной работы электрохимические аптасенсоры изготавливались на основе аптамера Apt31, который представляет собой ДНК-цепочку из 31 нуклеотида. Аптамер Apt31 является специфичным к шиповидному S-белку коронавируса и был разработан научной группой под руководством А.С. Кичкайло в Красноярском научном центре. Электрохимические биосенсоры на основе аптамеров, то есть аптасенсоры, позволяют быстро обнаруживать и количественно определять целевую

мишень. А главное, диагностику SARS-CoV-2 с помощью биосенсоров могут проводить люди без специализированного медицинского образования [13].

Целью данной дипломной работы является изучение возможности применения метода дифференциально-импульсной вольтамперометрии для диагностики COVID-19 с использованием аптасенсоров на основе аптамера Apt31.

Исходя из поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- Изготовить аптасенсоры с аптамером, специфичным к S-белку RBD-домена;
- Охарактеризовать полученные аптасенсоры;
- Оценить влияние концентрации RBD и редокс-медиатора ГЦФ на регистрируемый электрохимический сигнал;
- Провести электрохимические измерения в присутствии искусственной модельной слюны;
- Провести электрохимические измерения в присутствии проб здоровых и больных COVID-19 кандидатов;
- Провести проверочный эксперимент с зашифрованными пробами;
- Определить возможно ли разделение между собой проб здоровых и больных кандидатов с применением выбранного метода.

1 Обзор литературы

1.1 Коронавирусная инфекция COVID-19

1.1.1 Общая информация о коронавирусной инфекции COVID-19

Учёные-исследователи по всему миру занимаются поиском возможных способов борьбы с текущей пандемией, которая вызвана широким распространением коронавируса SARS-CoV-2. Вирус постоянно мутирует, что в свою очередь требует разработки не только методов лечения, но и методов обнаружения коронавируса.

В настоящее время есть два метода лабораторного обнаружения коронавирусной инфекции и связанного с ней вируса SARS-CoV-2:

1). Первый метод – это молекулярное распознавание, основанное на полимеразной цепной реакции (ПЦР-тест) с геномом вируса. Метод базируется на обнаружении молекул РНК вируса во взятом биологическом материале. Особое внимание при этом уделяется именно РНК SARS-CoV-2, то есть рибонуклеиновой кислоте, являющейся носителем генетической информации вируса. Однако, обнаружение нуклеиновых кислот с помощью ПЦР-теста занимает много времени. Для проведения анализа требуются дорогостоящие устройства и обученный медицинский персонал, что ограничивает возможности обнаружения [14].

2). Второй метод – серологическое тестирование, основанное на обнаружении антител IgM и IgG. Серологические тесты на COVID-19 могут быстро обнаруживать человеческие антитела к SARS-CoV-2) и позволяют получить информацию об иммунитете человека к данному вирусу, а также узнать был ли у человек когда-либо инфицирован. Некоторые тесты на антитела методом иммуноферментного анализа крови (ИФА) еще и определяют титр – количество выявленных антител. Однако серологические и иммунологические тесты демонстрируют низкую чувствительность и невысокий предел обнаружения [15].

Стоит обратить внимание на строение коронавируса, благодаря которому возможна разработка принципиально новых методов обнаружения. Основными биомаркерами SARS-CoV-2 являются белки шипа (S) и нуклеокапсида (N). Белок S состоит из двух субъединиц S1 и S2. Белок S1 содержит уникальный рецептор-связывающий домен (S-RBD), который может специфически взаимодействовать ферментом (ACE2) на поверхности клетки. Рецепторы ангиотензин превращающего фермента-2 (ACE2) обеспечивают проникновение коронавируса в клетку. S-RBD домен является идеальной мишенью для разработки биосенсоров для специфического распознавания SARS-CoV-2 [16].

Создание аптасенсоров на основе аптамеров, специфичных к S-белку RBD-домена открывает большие возможности для экспрессного и не дорогого обнаружения коронавирусной инфекции [17].

1.1.2 Структура RBD-домена, связывающего рецептор SARS-CoV-2

Шиповидный S-белок RBD-домена представляет собой гибкую область на вершине шипа коронавируса, которая позволяет вирусу закрепляться на поверхности клетки, проникая внутрь благодаря рецепторам ACE2 [18]. Структура S-белка SARS-CoV-2 показана на рисунке 4. Белок представляет собой тример, состоящий из трех идентичных мономеров (Рисунок 4а). Каждый мономер содержит RBD домен (Рисунок 4б) и может связываться с клетками человека [19].

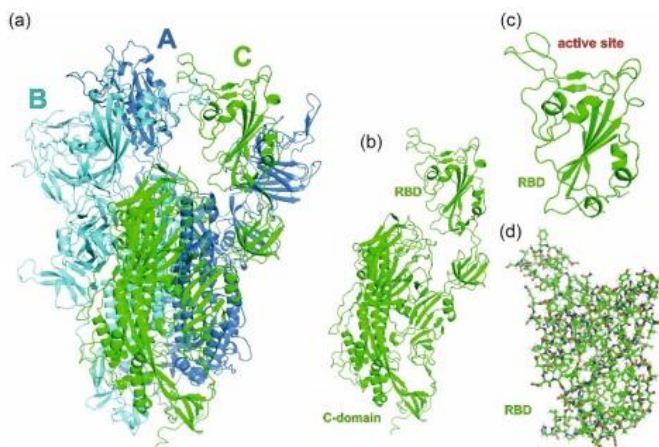


Рисунок 1 – Структура и свойства шиповидного белка SARS-CoV-2 RBD: а – тример шиповидного белка SARS-CoV-2, мономеры окрашены в синий, голубой и зеленый цвета; б – положение рецептор-связывающего домена (RBD) в мономере шиповидного белка; с - активная часть RBD; d – атомная модель RBD, где атомы С – зеленые, атомы N – синие, атомы O – красные, атомы S – желтые [19]

1.2 Аптасенсоры

1.2.1 Общее понятие об аптамерах

Термин «аптамеры» обычно относят к небольшим (обычно от 20 до 60 нуклеотидов) одноцепочечным молекулам нуклеиновых кислот, которые с высокой аффинностью и специфичностью связываются с необходимой молекулой [20]. В настоящее время получено большое количество аптамеров к самым разным мишеням,

начиная от простых неорганических молекул и заканчивая сложными белковыми комплексами и целыми клетками. Можно сказать, что аптамеры представляют собой нуклеотидные аналоги антител [21]. Однако, выбор в пользу аптамеров обусловлен более простым и существенно менее дорогостоящим процессом их получения. Также они являются более стабильными молекулами, а небольшой размер обеспечивает лучшее проникновение в органы и ткани [22].

Синтез аптамеров может сопровождаться введением различных химических группировок практически без ограничения по положению и химической структуре. Такие модификации повышают устойчивость аптамеров в условиях внешней среды, улучшают фармакокинетические показатели, увеличивают разнообразие библиотек аптамеров. Стоит отметить, что аптамеры термостабильны, так как способны выдерживать нагревание до 80–90°C без потери своих свойств [23,24].

1.2.2 Особенности строения аптамеров

Отличительной особенностью аптамеров является их способность к образованию вторичных структур – спиралей полипептидных цепей, которые удерживаются многочисленными водородными связями; а также третичных – клубков, которые существуют по средствам радикальных взаимодействий [22].

Наиболее важными для специфического связывания аптамеров с молекулами-мишенями являются неспаренные участки олигонуклеотида, а участки со стабильной вторичной структурой необходимы для поддержания правильного взаиморасположения функциональных групп. Это подтверждается тем, что многие участки аптамеров в свободном виде не структурированы и приобретают стабильную конформацию только после взаимодействия с мишенью.

Самые распространенные структурные элементы аптамеров:

1. Шпильки

Это один из самых распространенных мотивов вторичной структуры, встречающихся как в РНК, так и в ДНК- аптамерах.

2. Псевдоузлы

Структура псевдоузла образуется в результате комплементарных взаимодействий последовательности, ограничивающей шпильку справа или слева, с последовательностью петлевого участка шпильки. Псевдоузлы наиболее характерны для РНК-аптамеров, но встречаются также и в последовательностях ДНК.

3. Четырехнитевые структуры (квадруплексы)

Поперечное сечение квадруплекса, как правило, образовано четверкой гуаниновых нуклеотидов (G-квartetом). Каждое гуаниновое основание в G-квартете образует водородные связи с двумя соседними основаниями. Обычно в составе квадруплекса присутствуют 2 – 3 расположенных подряд G-квартета. Подобные структуры обладают очень высокой стабильностью [24].

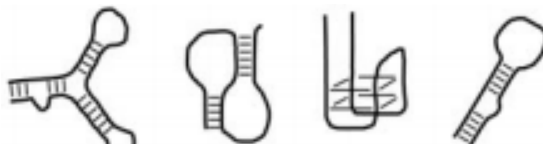


Рисунок 2 – Структурные элементы аптамеров [24]

1.2.3 Технология подбора аптамеров SELEX

Получение определенных последовательностей нуклеиновых кислот с необходимыми свойствами достигается направленным отбором из комбинаторных библиотек олигонуклеотидов методом SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment). Данный метод впервые был опубликован в 1990 году и описывал способность отобранных аптамеров связывать широкий спектр молекул-мишеней от крупных белков до небольших молекул [25,26].

Процедуры SELEX используют библиотеки случайных олигонуклеотидов, включающие до 10^{12} - 10^{15} различных молекул нуклеиновой кислоты. Процедура селекции проходит на протяжении 10-15 раундов. Раунды предназначены для отбора уникальных последовательностей, специфичных для молекулы-мишени. При отборе смесь олигонуклеотидов постепенно обогащается, и отбираются аптамеры, имеющие повышенное сродство к мишени. Аффинность аптамеров к мишени увеличивается на несколько порядков. Отбор олигонуклеотидов с большей аффинностью и отделение несвязавшихся с молекулой-мишенью олигонуклеотидов с меньшей аффинностью происходят благодаря жесткой конкуренции за место связывания [27,28]. Схематично процедура SELEX представлена на рисунке 3.

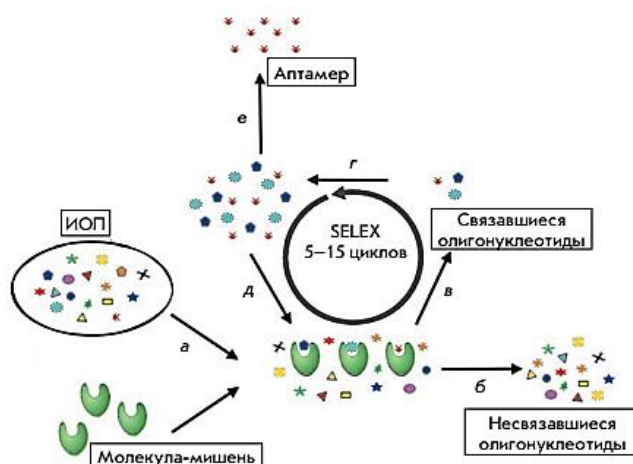


Рисунок 3 – Схема процедуры отбора аптамеров SELEX: а – инкубация исходного пула олигонуклеотидов с молекулой-мишенью; б – удаление не связавшихся олигонуклеотидов; в – отделение связавшихся олигонуклеотидов от молекулы-мишени; г – амплификация отобранных олигонуклеотидов в ходе несимметричной ПЦР (ДНК SELEX); д – инкубация обогащенного пула с молекулой-мишенью; е – клонирование аптамеров, полученных после проведения 5–15 раундов SELEX [29]

Технология SELEX применима не только для отбора аптамеров, способных связываться с молекулой-мишенью, но и для отбора олигонуклеотидов, обладающих определенной ферментативной активностью. В таком случае критерием отбора выступает способность аптамера катализировать такую реакцию [30,31].

1.2.4 Технология подбора аптамеров SIBDD

Особое внимание хотелось бы уделить ученым из Красноярского научного центра СО РАН, которые, совместно с исследователями из других стран, разработали новую методику отбора аптамеров. С помощью этой методики ученые создали аптамер длиной в 31 нуклеотид, специфичный к шиповидному S-белку коронавируса [19].

В лабораторных условиях поиск аптамеров обычно ведется из так называемых молекулярных библиотек с помощью метода SELEX (Систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением), который описан ранее. Такая селекция является сложным и трудоемким процессом [32,33]. По мнению ученых новый подход виртуального дизайна аптамеров под названием SIBDD (Structure and Interaction Based Drug Design, или дизайн лекарств на основе структуры и взаимодействия) позволяет увеличивать скорость разработки высокоаффинных аптамеров с нуля, используя структуру целевого белка. Также ученые предлагают использовать этот метод для улучшения уже существующих аптамеров [19].

Новый подход сочетает в себе несколько шагов. Сначала с помощью методов компьютерного моделирования с использованием суперкомпьютеров ведется поиск последовательностей нуклеотидов, ответственных за селективное присоединение к мишени. Результаты молекулярного дизайна, основанного на виртуальном скрининге готовых библиотек аптамеров ДНК и направленном мутагенезе для увеличения соответствия структуре белка-мишени, постоянно оцениваются с помощью трехмерного молекулярного моделирования процесса взаимодействия мишени и аптамера, а также определения квантово-механической устойчивости полученных комплексов.

На каждом этапе ведется экспериментальная проверка аффинности связывания с использованием малоуглового рассеяния рентгеновских лучей, проточной цитометрии и поляризационной флуоресценции [19]. Схематично технология создания аптамера изображена на рисунке 4.



Рисунок 4 – Дизайн лекарств на основе структуры и взаимодействия (SIBDD) [19]

С помощью метода SIBDD ученые получили ряд аптамеров с различным количеством и разной последовательность нуклеотидов составе: Apt 16 (1) (2), Apt 25 (1) (2), Apt 27 (1) (2), Apt 31 (1) (2).

Основными параметрами для дальнейшего отбора послужили полная энергия взаимодействия RBD-аптамер, а также число водородных связей. В таблице 1 отображена сравнительная характеристика аптамеров.

Более отрицательное значение полной энергии взаимодействия RBD-аптамер свидетельствуют о большей прочности связывания комплекса. Чем больше число водородных связей, тем выше аффинность связывания аптамера с RBD.

Путем аналитической обработки результатов ученые выделили два аптамера для дальнейших исследований: Apt27(2) и Apt31(1).

Последующий отбор подходящего аптамера осуществляли тремя методами: проточной цитометрией, флуоресцентной поляризацией и малоугловым рентгеновским

рассеянием. По результатам исследования исследователи создали модифицированный аптамер Apt31, высокоспецифичный к S-белку шипа коронавируса. Структурные особенности данного аптамера представлены на рисунке 5 [19].

Таблица 1 – Характеристические параметры аптамеров [19]

Аптамер	Количество Н-Н	Е _{полная} , ккал/моль
Apt 16 (1)	12	-153,0
Apt 16 (2)	9	-91,6
Apt 25 (1)	11	-159,2
Apt 25 (2)	12	-162,7
Apt 27 (1)	14	-200,1
Apt 27 (2)	17	-217,4
Apt 31 (1)	13	-221,6
Apt 31 (2)	9	-152,2

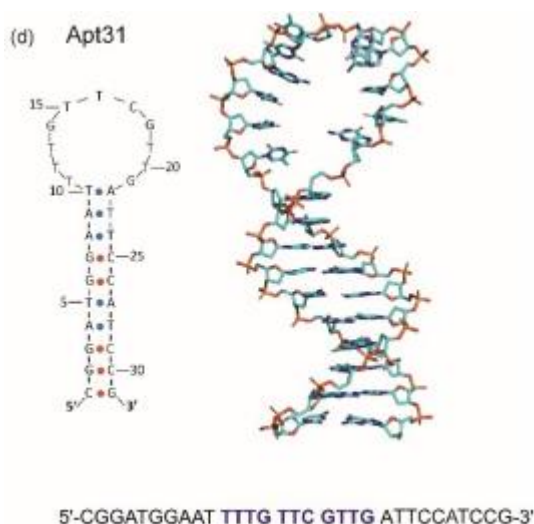


Рисунок 5 – Вторичная структура Apt31 из библиотеки аптамеров и соответствующая третичная структура, оптимизированная с помощью метода FMO2-DFTB3/PCM [19]

1.2.5 Использование аптасенсоров для диагностики SARS-CoV-2

В январе 2023 года группа ученых из Китая выпустили статью о разработке биочипов для экспрессного определения коронавирусной инфекции, а именно для обнаружения S- и N-белков SARS-CoV-2 и антител IgG. Биочипы отличаются скоростью получения результата за 10 минут и хорошей селективностью, что позволяет самостоятельно проводить скрининг подозрительных случаев на ранней стадии.

Ученые создали компактную тест-полоску, состоящую из пяти независимых биочипов, разделенных по категориям биомаркеров (иммуносенсоры и биосенсоры).

В качестве иммуносенсоров были выбраны антитела S₁-IgG и белок S₁ для распознавания белка в образцах мазка слюны и в крови. Что касается аптасенсоров, то с помощью метода SELEX были отобраны два S₁-специфичных аптамера (RBD-Ap-1, RBD-Ap-2) и один N-специфический (N-Ap) аптамер. Аптамеры были закреплены на биочипах и выступали в качестве сенсоров для обнаружения S₁ и N белков коронавируса.

Для исследования иммуносенсорных и аптасенсорных биочипов использовали электроды, модифицированные наночастицами золота (диаметром ~154 нм).

Созданные биочипы прошли испытание на реальных пробах SARS-CoV-2 больных и здоровых людей. Анализ пяти зашифрованных проб показал, что аптамеры RBD-Ap-2 и N-Ap с точностью 100% помогают определить ковид-положительных и ковид-отрицательных пациентов. Однако, RBD-Ap-1 показал низкую селективность по отношению к положительным и отрицательным пробам.

По результатам проведенных исследований группа ученых подвели итоги:

- Созданный биочип является очень чувствительным сенсором и позволяет обнаруживать даже следовые количества S- и N-белков SARS-CoV-2;
- С помощью биочипа можно проводить диагностику антител IgG;
- Набор биочипов является экспрессным, недорогим и быстрым способом определения SARS-CoV-2 [34].

1.2.6 Схема исследования аптасенсоров

Последние десять лет активно развиваются теоретические экспериментальные представления об адсорбции серосодержащих соединений на золотой поверхности и получении на их основе самоорганизующихся монослоев (SAM). Образующиеся при адсорбции организованные тонкие органические пленки обладают широким кругом полезных свойств, среди них: биологическая и фотохимическая активность, сверхпроводимость, каталитическая активность и возможность переноса заряда [35].

Самоорганизованные монослои (SAM) представляют собой молекулярные сборки, спонтанно образующиеся на поверхности твердой подложки в результате адсорбции и организованные в более или менее крупные упорядоченные системы. Иногда, молекулы, формирующие монослой, не взаимодействуют с подложкой. Однако, существуют молекулы с головными группами, которые обладают сильным сродством к субстрату и прикрепляют молекулу к нему. Такой SAM, состоящий из головной группы, хвоста

функциональной концевой группы, изображен на рисунке 6. Общие головные группы включают тиолы, силаны, фосфонаты и т.д. [36].

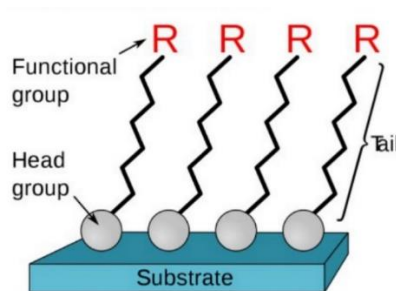


Рисунок 6 – Представление структуры SAM [36]

SAM образуются путем хемосорбции «головных групп» на подложку из паровой или жидкой фазы последующей организацией «хвостовых групп». Первоначально, при небольшой молекулярной плотности на поверхности, молекулы адсорбата образуют либо неупорядоченную массу молекул, либо упорядоченную двумерную «лежащую фазу». При более длительном выдерживании, от нескольких минут до часа, начинают формироваться трехмерные кристаллические или полукристаллические структуры на поверхности подложки. «Головные группы» собираются вместе на подложке, в то время как хвостовые группы собираются вдали от подложки. Области плотноупакованных молекул зарождаются и растут до тех пор, пока поверхность подложки не будет покрыта одним монослоем [37].

Молекулы адсорбата легко адсорбируются, поскольку они снижают поверхностную свободную энергию субстрата и являются стабильными из-за сильной хемосорбции «головных групп». Связи тиол-металл составляют порядка 100 кДж/моль, что делает их довольно стабильными при различных температурах, растворителях и потенциалах [38].

Выбор типа головной группы зависит от области применения SAM. Чаще всего головные группы связаны с молекулярной цепью, на конце которых прикрепляется функциональная группа (например, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$ или $-\text{SH}$). С помощью концевой группы можно влиять на различные физические свойства монослоя.

Большой интерес вызывают SAM, получающиеся в результате адсорбции органических молекул, содержащих одновременно серосодержащий фрагмент и способную к координации с катионом переходного металла хелатирующую группировку. Алкантиолы выступают наиболее часто используемыми молекулами для SAM. После "привязывания" к поверхности за счет серосодержащего фрагмента лиганды подобного

типа при комплексообразовании с ионами металлов дают металлокомплексные поверхности, интересные для использования в катализе и для моделирования механизма действия металлоферментов, встроенных в биологические мембраны.

В качестве подходящих подложек для изготовления высокоактивных электродов применяют металлы, такие как Au, Pt и Ag. Особое внимание уделяют золотым электродам, так как на их основе образуются стабильные и воспроизводимые поверхности. Важным фактором при использовании твердых электродов является зависимость отклика (с точки зрения активности, стабильности и воспроизводимости) от качества поверхности электрода. Поэтому принципиально важно изучить процессы предварительной обработки поверхности электродов для получения желаемых результатов.

В качестве примера предварительной подготовки электродов хотелось бы привести работу коллег из бразильского университета UNICAMP. Задача их исследования состояла в сравнении процедур предварительной обработки золотого электрода для очистки поверхности и формирования тиоловых SAM.

- Процедура механической предварительной обработки (М) состояла из ручной полировки золотых электродов до зеркального блеска с помощью суспензии оксида алюминия (размер частиц: 0,5 и 0,3 мкм). После чего электроды были промыты водой и очищены ультразвуком в течение 1 минуты.
- Процедура химической предварительной обработки (С) включала в себя погружение золотого электрода в раствор пирании (смесь H_2SO_4 , H_2O , H_2O_2) примерно на 10 мин. Затем электроды также были промыты водой и очищены ультразвуком.
- Электрохимическую предварительную обработку (Е) проводили путем 25 последовательных сканирований между окислительно-восстановительными потенциалами золота (от -0,1 В до $\approx 1,2$ В по сравнению с SCE) в 0,5 М растворе H_2SO_4 при 100 мВ/с. Очистка электрода аналогична предыдущим.

Оценка влияния вышеперечисленных процедур на изменение поверхности электрода было сделано путем интегрирования пиков восстановления оксида золота на полученных вольтамперометрических кривых. Данные были получены при 25°C в диапазоне 0,1 В и 1,1 В, скорость сканирования составила 50 мВ/с, в 0,1 М фосфатном буфере при pH 7,0. Тогда ESA – это соотношение между зарядом восстановления оксида золота, представленным на поверхности исследуемого электрода. Расчеты ESA выразили в виде коэффициента шероховатости на единицу геометрической площади поверхности.

Для формирования SAM золотые электроды погружали в 10 ммоль/л раствор этанола примерно на 10 мин. После чего электроды промывали чистым этанолом и водой перед использованием. Портер и его коллеги изучили восстановительную десорбцию алкантиолов и продемонстрировали, что данный процесс можно использовать для характеристики SAM алкантиолов. Было доказано, что восстановительный заряд, необходимый для десорбции, может быть использован для оценки количества хемосорбированных тиолов.

Восстановительную десорбцию SAM проводили с использованием дифференциальной импульсной вольтамперометрии. В качестве фонового электролита был выбран 0,1 М раствор КОН, который дегазировался азотом в течение 30 мин перед каждым экспериментом. Условия для получения данных: начальный потенциал $\approx 0,1$ В, конечный потенциал 1,3 В, частота сканирования 20 мВ/с, амплитуда 25 мВ и длительность импульса 50 мс.

В результате своего исследования коллеги сделали выводы о том, что предварительная обработка поверхности является необходимым этапом при изучении SAM, так как влияет на электрохимическую активность золотой подложки. С помощью электрохимической обработки шероховатость электрода сводится к минимуму, что позволяет получать более воспроизводимые поверхности. Явление восстановительной десорбции тиолов на золотых электродах предоставляет ценную информацию о характеристиках SAM, образующихся после различных процедур предварительной обработки. Также была установлена важная взаимосвязь путем сравнения восстановительной десорбции SAM по данным дифференциальной импульсной и циклической вольтамперометрии. Из профиля двух пиков оказалось, что пик, установленный при более отрицательных значениях потенциала, соответствует расщеплению связи золото-сера. Главная гипотеза исследования была доказана – предварительная обработка поверхности электрода позволяет снизить количество оксидов на золотой подложке, получая при этом плотноупакованные стабильные SAM [39].

Важно заметить, что традиционные диагностические и терапевтические препараты все чаще начинают замещаться средствами, производимыми с помощью современных биотехнологий. В 2010 году доля таких препаратов на мировом рынке составила 50% [40]. Особую популярность приобретают средства диагностики и терапии на основе аптамеров, которые позволяет выявлять болезни на ранних стадиях и оказывать целевое воздействие на конкретную мишень в организме [41]. Получение аптамеров для терапии или диагностики осуществляется с помощью технологии SELEX, а также, с недавних пор, стало возможным получение аптамеров по средствам компьютерного моделирования.

Каждый аптамер обладает своим уникальным кодом, который может храниться в цифровом виде, благодаря чему аптамеры называют «цифровыми лекарствами» [42].

Таким образом, можно предположить, что благодаря отличительным свойствам аптасенсоры в скором времени займут достойное место как при лечении социально значимых заболеваний, так и в других сферах жизни человека. А исследование качества и стабильности воспроизводимых систем станет одним из наиболее перспективных направлений в науке.

1.3 Электрохимический анализ

Методы электрохимического анализа основаны на изучении и использовании процессов, протекающих на поверхности электрода или в приэлектродном пространстве. Аналитическим сигналом в электрохимических методах могут выступать параметры, которые функционально связаны с присутствием и/или концентрацией определяемого компонента системы. Такими параметрами являются потенциал (E), сила тока (I), сопротивление (R), электрическая проводимость (W), количество электричества (Q) и т.д. [43].

Благодаря электрохимическим методам можно определять вещества различной природы. Методы чувствительны и высоко избирательны к органическим и неорганическим веществам. Так высокой чувствительностью отличаются кулонометрия и вольтамперометрия, а методы ионометрии и электрогравиметрии используются при необходимости получения экспрессного результата с особой избирательностью. С помощью вольтамперометрических методов анализа можно определять концентрации веществ порядка $10^{-6} - 10^{-8}$ моль/л, редко концентрации веществ порядка $10^{-9} - 10^{-10}$ моль/л [44].

Для того, чтобы проводить электрохимическое измерение необходима электрохимическая цепь, которая состоит из электрохимической ячейки с электродами и анализируемого раствора. Сигнал в электрохимической системе формируется на границе раздела фаз электрод-раствор. Индикаторный сигнал зависит от поверхности электрода, в особенности от его механической неоднородности и дефектности, также большую роль играет природа материала электрода. Поверхность электрода можно целенаправленно модифицировать, для получения необходимых аналитических параметров [45-49].

В вольтамперометрии есть два параметра, которые используются в качестве качественных характеристик – потенциал полуволны ($E_{1/2}$) и потенциал максимума тока (I). Обе величины зависят от природы вещества, подвергающегося электропревращению.

Анализируя потенциал полуволны и потенциал максимума тока можно узнать состав исследуемого раствора [50-51].

Количественный анализ базируется на уравнение Ильковича, которое описывает зависимость диффузионного тока от концентрации электроактивного вещества (в данном случае для ртутной капли):

$$I_d = 607ncD^{1/2}m^{2/3}\tau^{1/6} = Kc, \quad (1)$$

где I_d – диффузионный ток (мкА);

n – число электронов, участвующих в электродной реакции;

c – концентрация электроактивного вещества (ммоль/л);

D – коэффициент диффузии вещества (см²/с); m – скорость вытекания ртути (мг/с);

τ – время жизни капли (с);

K – коэффициент пропорциональности. Величины D , m и τ в стандартных условиях обычно постоянны [52].

1.4 Вольтамперометрические методы анализа

На данный момент существует огромное количество ВА методов анализа. Для того, чтобы структурировать информацию, были выбраны некоторые параметры, по которым методы ВА можно классифицировать:

- По направлению развертки (циклическая, катодная и анодная);
- По типу индикаторного электрода (ВА с металлическими и неметаллическими электродами);
- По способу наложения потенциала (нормальная и дифференциальная импульсная) и так далее [53].

В данной дипломной работе использовались циклическая и импульсная вольтамперометрия.

Циклическая ВА отличается от других методов циклическим изменением потенциала. Сначала потенциал рабочего электрода линейно возрастает во времени, а после достижения заданного потенциала увеличивается в обратном направлении, возвращаясь к исходному потенциалу. В методе ЦВА регистрируются отдельные пики, которые описывают процессы окисления или восстановления, протекающие на поверхности твердого электрода.

Схематично протекающие реакции можно описать уравнениями:





В результате протекающих процессов, можно зафиксировать изменение тока на индикаторном электроде и проанализировать графическое отображение процессов, то есть циклическую вольтамперограмму (Рисунок 7). Вольтамперограммы могут отличаться между собой, так как их вид зависит от геометрии электрода, параметров ячейки и так далее.

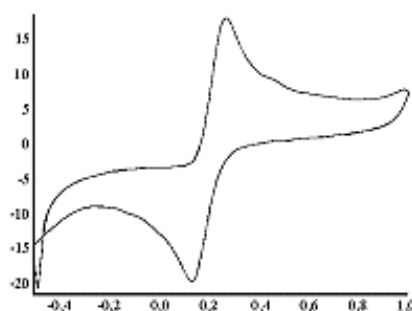


Рисунок 7 – Реальная циклическая ВА для обратимой системы [51]

На рисунке 7 видно, что циклическая ВА состоит из двух ветвей – катодной (восстановление) и анодной (окисления) [51].

Потенциал индикаторного электрода можно менять импульсами различной формы (треугольными, прямоугольными и тд.). За счет увеличения соотношения фарадеевского и емкостного тока возможно существенно уменьшить нижнюю границу концентраций определяемых веществ. С помощью импульсной подачи напряжения методы становятся более чувствительным [52-55]. Существуют два способа наложения импульсов – нормальный и дифференциальный.

1.4.1 Нормальная импульсная ВА

Поляризация индикаторного электрода осуществляется с помощью подачи прямоугольных импульсов с возрастающей амплитудой от постоянного начального потенциала. Каждый импульс подается с интервалом 50 мс. Максимальное значение амплитуды импульсов может составлять 1000 мВ.

Изменение силы тока фиксируют в конце наложения импульса за 10-15 мс до конца его подачи. За счет высокой амплитуды импульсов их продолжительность очень мала, в результате этого возникает большой градиент концентрации электроактивного вещества и, соответственно, значительный фарадеевский ток. Измерения проводят при условии

постоянной площади поверхности капли, соответственно емкостный ток, в отличие от фарадеевского, будет мал.

Вольтамперограмма фиксируется в виде зависимости тока от амплитуды импульса напряжения. Такая зависимость имеет ступенчатую форму (Рисунок 8). Если представить ВА в виде зависимости разности измеренного и предыдущего значений токов, то такая зависимость будет иметь вид кривой с максимумами (пиками).

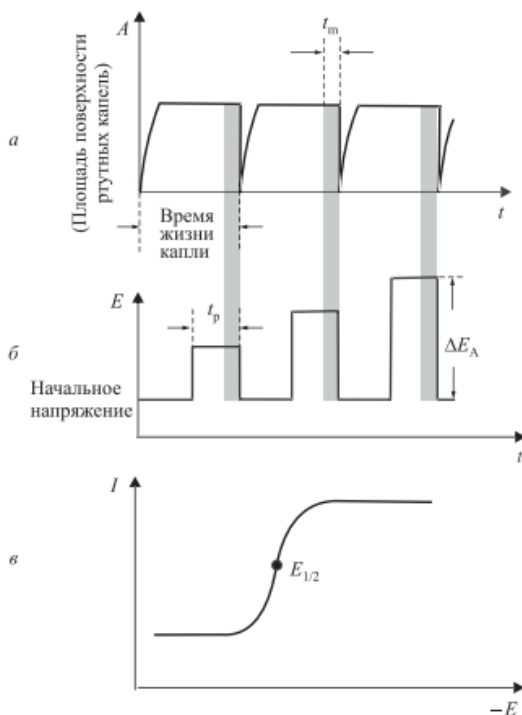


Рисунок 8 – Способ измерения в нормальной импульсной полярографии: а – рост капли (для статического ртутного капельного электрода); б – развертка потенциала; в – вольтамперограмма [56]

Благодаря импульсам, которые подаются линейно, удастся существенно снизить длительность воздействия приложенного импульса на диффузионный слой электрода. За счет этого снижается вклад от диффузионного тока более электроположительных компонентов в процессе развертки (возрастания амплитуды налагаемых импульсов). Электрод большую часть времени находится под минимальным потенциалом и лишь при наложении импульсов смещается в область разряда компонентов [56-58].

В сравнении с классической полярографией чувствительность нормальной импульсной полярографии примерно в 10 раз выше. Метод обладает рядом преимуществ перед классическим способом измерений:

- при использовании стационарных электродов позволяет осуществлять контроль процессов в потоке и иных, требующих непрерывных измерений;

- продукты электродных реакций в промежутках между короткими импульсами способны подвергаться обратному электропревращению и удаляться с поверхности электрода [56].

Нормальная импульсная ВА зарекомендовала себя как эффективный метод работы, особенно с твердыми индикаторными электродами (золото, платина, графит), так как линейная непрерывная развертка способствует скоплению на твердой поверхности разрядившихся компонентов системы [59].

1.4.2 Дифференциально-импульсная ВА

Метод дифференциальной импульсной ВА является важнейшим, так как обладает наилучшими аналитическими характеристиками. Поляризация индикаторного электрода происходит посредством линейного или с помощью цифровой измерительной аппаратуры ступенчатого изменения постоянного напряжения, на которое накладывают небольшие импульсы прямоугольной формы с интервалом в 50 мс и постоянной амплитуды порядка 50 мВ. Измерение силы тока проводят как до подачи импульса, так и в конце наложения импульса [56,60].

Вольтамперограмма имеет вид первой производной вольтамперометрической волны. Кривая на ВА показывает зависимость разности токов от линейно увеличивающегося постоянного напряжения. Максимум на вольтамперограмме соответствует потенциалу полуволны (Рисунок 9).

Дифференциальный способ измерения приводит к дальнейшему уменьшению емкостного тока за счет чего значительно повышает чувствительность по сравнению с нормальной импульсной полярографией.

Если электродный процесс является обратимым, то высота пика на дифференциальной импульсной ВА прямо пропорциональна концентрации электроактивного вещества C_a и зависит от амплитуды импульса E_A , а также от продолжительности импульса t_p .

$$I_p = \frac{n^2 \cdot F^2}{4RT} A \cdot c_a \cdot \Delta E_A \cdot \sqrt{\frac{t}{n \cdot t_p}} \quad (4)$$

По мере увеличения амплитуды импульса пики ВА кривой становятся выше и шире. Таким образом, возрастает чувствительность, однако ухудшается разрешающая способность. Как правило оптимальная амплитуда импульсов подбирается экспериментально.

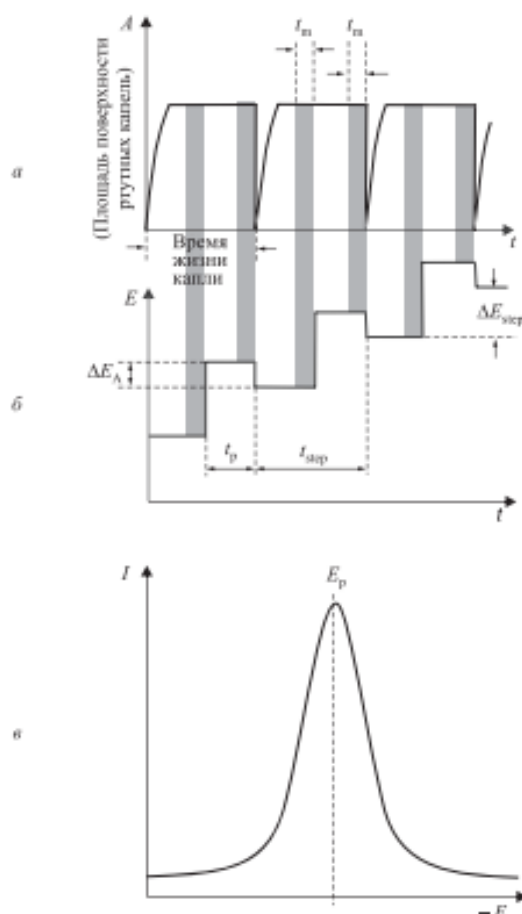


Рисунок 9 - Способ измерения в дифференциальной импульсной ВА: а – рост капли (для статического ртутного капельного электрода); б – модулированная развертка потенциала; в – вольтамперограмма [56]

Потенциал пика и потенциал полуволны в классической вольтамперометрии связаны соотношением:

$$E_p = E_{1/2} - \frac{\Delta E_A}{2} \quad (5)$$

При подаче импульсов отрицательного знака потенциал пика смещается относительно потенциала полуволны на $\Delta E_A/2$ в область менее отрицательных значений, а при подаче импульсов положительного знака – на такую же величину в более отрицательную область.

При малых ΔE_A полуширина пика $b_{1/2}$ определяется соотношением:

$$b_{1/2} = 3,52 \frac{RT}{nF} \quad (6)$$

Дифференциальная импульсная вольтамперометрия является высокочувствительным и избирательным методом. Она применяется при определении следовых количеств металлов и биологически активных веществ, а также позволяет анализировать растворы с концентрацией порядка 10^{-8} моль/л и определять ионы с близкими потенциалами полуволн в одном растворе [56,59,61].

В целом стоит отметить, что современная вольтамперометрия является высокочувствительным и экспрессным методом определения многих веществ, как органических, так и неорганических. Методы пригодны для анализа медицинских и геохимических объектов [62].

Широкое распространение электрохимические методы получили в области определения веществ в потоках жидкостей, ввиду простоты их выполнения и невысокой стоимости аппаратуры. Также методы электрохимии используются в фармацевтической и фармакопейной областях [63,64].

2 Материалы и методы

2.1 Приборы и оборудование

Для получения экспериментальных данных использовали следующее оборудование и приборы:

- Электрохимическая станция CH 660 (CH Instruments, США);
- Трех-электродная ячейка:
 - электрод сравнения (хлорид-серебряный с 1М KCl),
 - вспомогательный электрод (Pt проволока),
 - индикаторный золотой электрод (золотой диск, 2 мм в диаметре);
- Ультразвуковая ванна;
- Химические стаканы 50 мл, 100 мл; плоскодонные колбы с притертыми стеклянными пробками 100 мл, 200 мл; пробирки 5 мл; медицинские шприцы 2 мл, 5 мл; пинцет; дозаторы 10-100 мкл, 50-150 мкл; чашки Петри; фильтровальная бумага; ватные палочки; полиэтиленовая плёнка.

2.2 Реактивы

- Инертный газ – аргон (Ar);
- Фосфатный буферный раствор с pH=7,4 (PBS);
- Редокс медиатор – гексацианоферраты (II и III) калия (0,025 М, 0,01 М, 0,05М);
- ДНК-аптамер марки Apt31, специфичный к S-белку RBD-домена (предоставлен ФИЦ КНЦ СО РАН в замороженном виде);
- Замороженные пробы RBD (0,0044; 0,022; 0,33; 0,15 мкмоль/л);
- Замороженные пробы смывов слюны после ПЦР-теста ковид-положительных и ковид-отрицательных пациентов;
- Раствор человеческого альбумина 20%;
- Лизирующий раствор;
- Растворы HCl (хч, 35%), H₂SO₄ (хч, 98%), H₂O₂ (хч, 30%), KCl (чда, 0,1 моль/л).

2.3 Методы, использованные для электрохимической обработки и измерений

Все работы выполнялись при соблюдении техники безопасности для химических лабораторий (Приложение А).

- Циклическая вольтамперометрия (ЦВА);
- Потенциостатическая обработка;
- Дифференциальная импульсная вольтамперометрия (ДИВА).

2.4 Методики подготовки материалов

— Размораживание аптамера

Нагревали стакан с водой до 94 °C в сушильном шкафу «Binder». Бюкс с аптамером погружали в нагретую воду и выдерживали 10-11 минут. Затем остужали аптамер на льду в течении 10 минут и оставляли в холодильнике (4 °C) на сутки.

— Подготовка проб

Модельные белки RBD, а также реальные объекты (пробы смывов слюны) хранили в замороженном виде. Перед началом эксперимента выдерживали пробы при комнатной температуре в течение 30 минут для размораживания.

— Приготовление искусственной слюны

Разбавляли раствор человеческого альбумина до 30 мг/л раствором фосфатного буфера для создания концентрации как в настоящей слюне. Обмакивали ватную палочку в приготовленном растворе и помещали в лизирующий раствор. Полученную слюну оставляли в холодильнике (4 °C) на один час.

2.5 Методика подготовки электродов к нанесению аптамера

Перед началом любых электрохимических измерений проводили механическую и ультразвуковую чистку электродов, а также электрохимическую обработку.

- Механическая и УЗВ чистка

На первом этапе шлифовали поверхность каждого электрода по 1 минуте на наждачной бумаге двух типов с использованием мелкодисперсной пасты 0,5, 0,1, 0,05 мкрн. Затем промывали электроды и обрабатывали ультразвуком в растворе этилового спирта в течение 5 минут.

На этапе химической чистки наносили на поверхность золота свежеприготовленный раствор «Пирания» (H_2SO_4 150 мкл + H_2O_2 50 мкл). Выдерживали раствор в течение 5 минут. После этого промывали электроды дистиллированной водой и высушивали в токе аргона.

- Электрохимическая обработка

В электрохимическую ячейку с раствором PBS устанавливали электроды, подключали контакты электродов и проводили циклирование потенциала в заданном диапазоне (от 0,8 В до -1,4 В со скоростью развертки 0,3 В/с) до постоянной формы вольтамперограммы. После этого выдерживали электроды при постоянном потенциале -1,4 В в течение 30 секунд.

2.6 Схема и методика проведения измерений

Предварительно, за 30 минут до начала съемки проводили дегазацию рабочих растворов в токе аргона. В зависимости от этапа исследования, регистрировали электрохимический сигнал системы с использованием двух вольтамперометрических методов – ЦВА и ДИВА.

- Сигнал от золотой поверхности электрода

Подготовленный электрод промывали раствором PBS, устанавливали в ячейку с раствором редокс-медиатора ГЦФ и производили электрохимические измерения. Методом ЦВА регистрировали сигнал одного цикла в диапазоне от -0,5 В до 0,8 В со скоростью развертки 0,03 В/с. Методом ДИВА регистрировали электрохимический сигнал в диапазоне от -0,2 В до 0,8 В с периодичностью подачи импульса 0,5 с. По окончании электрохимических измерений промывали рабочий электрод раствором PBS.

- Приготовление аптасенсора

Повторяли процедуру ЭХО, затем удаляли лишнюю влагу с поверхности рабочего электрода и помещали электрод в заранее подготовленный химический стакан с влажной атмосферой. Наносили 10 мкл раствора аптамера Apt31 и герметизировали стакан. Выдерживали в холодильнике при температуре 4°C в течение 24 часов.

- Сигнал от аптасенсора без исследуемой пробы

После контакта с аптамером электрод промывали раствором PBS и устанавливали в электрохимическую ячейку. Повторяли процедуру съемки методом ЦВА/ДИВА, используя ранее заданные параметры. Далее электрод промывали раствором PBS, удаляли лишнюю влагу с поверхности и вновь помещали в химический стакан для последующей инкубации с пробой.

- Инкубация с исследуемой пробой (в качестве проб выступали: раствор RBD, смывы слюны, искусственная модельная слюна)

Фиксировали рабочий электрод в химическом стакане с влажной атмосферой, на золотую поверхность наносили 10 мкл исследуемой пробы, герметизировали стакан и оставляли при комнатной температуре на 1 час.

- Сигнал от аптасенсора после контакта с исследуемой пробой

После контакта с пробой электрод промывали раствором PBS и устанавливали в ячейку. Повторяли процедуру съемки методом ЦВА/ДИВА, используя ранее заданные параметры.

2.7 Обработка полученных результатов

Для каждой полученной выборки (минимум 3 значения) рассчитывалось среднее арифметическое значение выборки, используя формулу:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (7)$$

Дисперсия выборки рассчитывалась следующим образом:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (8)$$

Расчёт погрешности (Δ) для среднего значения выборки производился с использованием коэффициента Стьюдента, соответствующего данной выборке и СКО по следующей формуле:

$$\Delta = \frac{t(P, f) \cdot S(x)}{\sqrt{n}}, \quad (9)$$

где t – коэффициент Стьюдента для заданных P и f ;

P – вероятность;

f – число степеней свободы;

n – количество измерений в серии;

$S(x)$ – СКО.

Грубый результат выборки, содержащей от 3 до 10 значений, оценивался по Q-критерию в соответствии со следующими формулами:

$$Q_i = \frac{|x_1 - x_2|}{|x_1 - x_n|}, \quad (10)$$

если подозрительное значение в начале, или

$$Q_i = \frac{|x_{n-1} - x_n|}{|x_1 - x_n|}, \quad (11)$$

если подозрительное значение в конце выборки.

Грубый результат выборки, содержащей более 10 значений, оценивался с использованием t-критерия Стьюдента:

$$t_i = \frac{|x_i - \bar{x}|}{S(x)} \sqrt{n}, \quad (12)$$

где x_i – проверяемое на грубость значение выборки; $\bar{x}$ – среднее арифметическое выборки;

$S(x)$ – СКО; n – число измерений.

Расчет прироста параметра производился в соответствии со следующей формулой:

$$\Delta P_i = \frac{(P_i^s - P_i^a)}{P_i^a} \times 100\%, \quad (13)$$

где P_i – параметр, полученный из экспериментальных данных (величина тока пика или площадь под пиком); P_i^s – значение параметра для аптасенсора после контакта с пробой; P_i^a – значение параметра для аптасенсора до контакта с пробой. Прирост параметра в процентах может быть положительным (при увеличении значения параметра после контакта аптасенсора с пробой) или отрицательным (при уменьшении значения параметра после контакта с пробой).

3 Результаты и обсуждение

3.1 Выбор методики химической обработки поверхности золотых электродов

На начальном этапе проведения эксперимента было необходимо подобрать методику химической подготовки поверхности золотых электродов. Было выбрано два варианта химической обработки золотой поверхности: первый – раствор HCl 35%; второй – раствор «Пирания», который состоит из раствора H_2SO_4 98% и раствора H_2O_2 30% в соотношении 1:3. Две указанные обработки были проведены для двух групп электродов в трех параллельных экспериментах. Далее проводилась иммобилизация аптамера и измерение степени заполнения поверхности, которая должна быть наибольшей для дальнейшего применения. Полученные результаты представлены в таблице 2 и в таблице 3, графически отображены на рисунке 10.

На рисунке 10 наблюдается отсутствие изменения электрохимического сигнала до и после иммобилизации аптамера на электрод. Коэффициент заполнения поверхности электрода по катодному и анодному пикам составил 0,4% и 3%, соответственно. Такой результат позволяет сделать вывод о том, что аптамер на электроде не закрепляется, а обработка электродов раствором HCl 35% является неэффективной.

Использование раствора «Пирания» демонстрирует положительную динамику в изменении электрохимического сигнала. Коэффициент заполнения поверхности электрода по катодному и анодному пикам составил 40% и 20% соответственно. На рисунке 10 наблюдается изменение сигнала, которое вероятно связано с формированием слоя молекул аптамера на поверхности электрода. Соответственно, травление раствором «Пирания» было выбрано в качестве химической обработки поверхности золотого электрода перед иммобилизацией аптамера для дальнейших исследований.

Таблица 2 – Результаты измерения площади пиков на ЦВА после обработки HCl, при концентрации ГЦФ 0,025 моль/л

S _a , мкКл		S _к , мкКл	
Чистый	Apt31	Чистый	Apt31
3,9	4,3	-5,8	-5,3
4,4	4,1	-5,5	-5,6
3,6	3,3	-6,1	-6,2
31,9	3,7	-5,6	-5,8
Среднее значение			
4,0	3,8	-5,8	-5,7
Коэффициент заполнения			
—	3%	—	0,4%

Таблица 3 – Результаты измерения площади пиков на ЦВА после обработки раствором «Пиранья», при концентрации ГЦФ 0,025 моль/л

S _a , мкКл		S _к , мкКл	
Чистый	Apt31	Чистый	Apt31
8,0	9,7	-0,1	-4,8
1,54	2,5	-7,1	-4,5
1,7	2,3	-2,3	-2,8
8,7	7,4	-5,1	-1,0
1,8	2,1	-2,4	-2,2
1,8	2,1	-2,3	-3,2
Среднее значение			
3,9	3,3	-4,9	-3,1
Коэффициент заполнения			
—	20%	—	40%

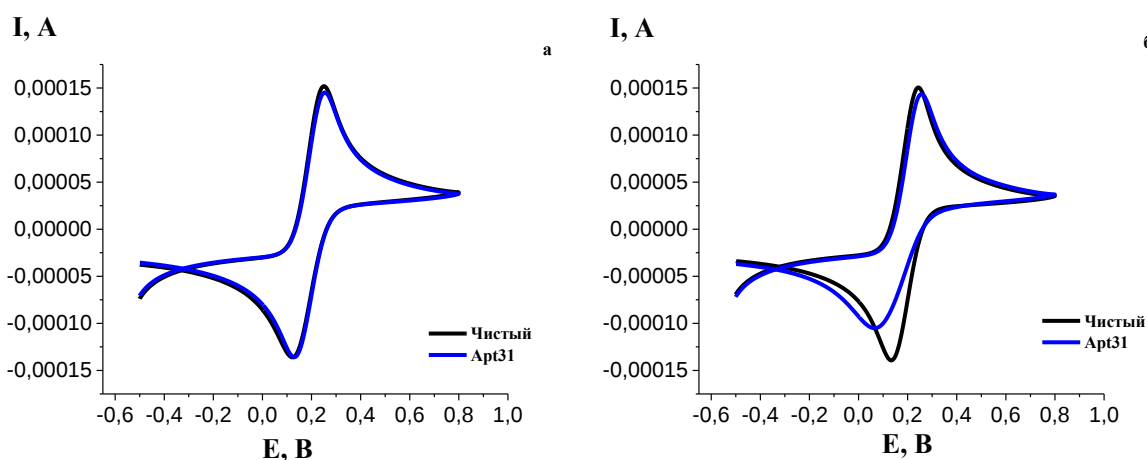


Рисунок 10 – Изменение электрохимического сигнала ЦВА после контакта с аптамером Apt31: а – после обработки раствором HCl, б – после обработки раствором «Пиранья»

3.2 Создание воспроизводимого слоя аптамера Apt31 на поверхности электрода

3.3 Изучение способности иммобилизованного на электрод аптамера Apt31 связывать S-белок RBD-домена

3.4 Изучение влияния концентрации RBD на изменение электрохимического сигнала

Далее проводились эксперименты по изучению влияния концентрации целевого белка на сигнал аптасенсора. В таблице 11 приведены значения площади катодных и анодных пиков, полученные методом ЦВА при концентрации RBD равной 0,022 мкмоль/л. При данных условиях прирост параметра по анодному пику составил 3%, по катодному пику 5% (Таблица 11). На рисунке 16 наблюдается уменьшение площади и высоты анодного и катодного пиков.

В таблице 12 приведены значения площади анодного и катодного пиков, полученные методом ЦВА при концентрации RBD-пробы равной 0,33 мкмоль/л. При данной концентрации прирост параметра для анодного пика составил 14%, катодного 8% (Таблица 12). Также, в соответствии с рисунком 17, наблюдается отчетливое снижение высоты и уменьшение площади катодного и анодного пиков.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о том, что с ростом концентрации RBD увеличивается количество связанного аптамером белка.

Таблица 11 – Результаты измерения площади пиков на ЦВА чистого электрода, после контакта с аптамером Apt31, после инкубации с RBD-пробой ~0,022 мкмоль/л, при концентрации ГЦФ 0,025 моль/л

S _a , мкКл			S _к , мкКл		
Чистый	Apt31	Apt31+RBD	Чистый	Apt31	Apt31+RBD
7,9	9,7	8,5	-10,1	-4,8	-5,6
1,5	2,5	2,5	-7,1	-4,5	-3,8
1,7	2,3	42,4	-2,3	-2,8	-2,5
9,0	7,4	5,8	-5,1	-1,0	-1,0
29,3	2,1	2,2	-2,4	-2,2	-1,9
30,2	2,1	2,2	-2,3	-3,2	-2,9
Среднее значение					
26,8	4,4	4,2	-4,9	-3,1	-2,9
Коэффициент заполнения			Коэффициент заполнения		
–	80%		–	40%	
Прирост параметра			Прирост параметра		
–	–	3%	–	–	5%

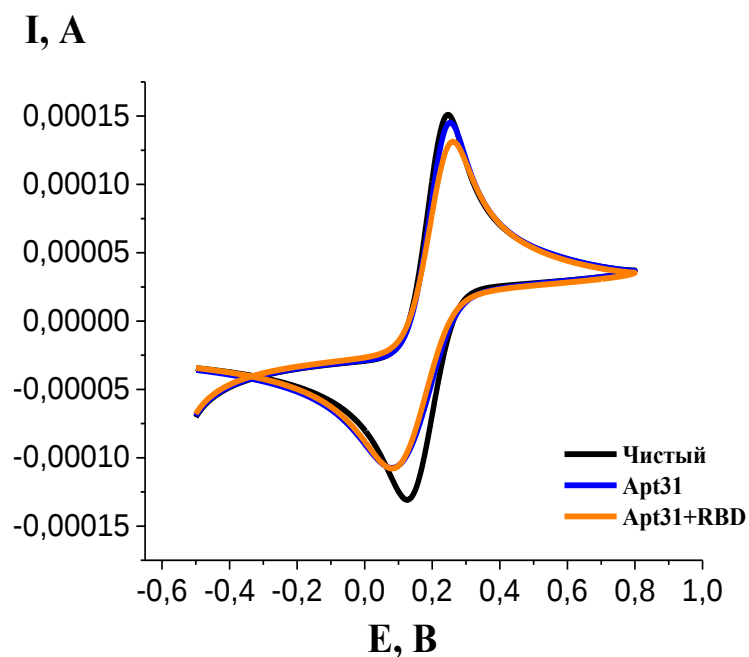


Рисунок 16 – Изменение электрохимического сигнала ЦВА после нанесения аптамера Apt31, после инкубации с RBD-пробой ~0,022 мкмоль/л (ГЦФ 0,025 моль/л)

3.5 Изучение влияния концентрации редокс-медиатора ГЦФ на изменение электрохимического сигнала

Наряду с исследованием о влиянии концентрации целевой RBD-пробы на сигнал аптасенсора, проводился эксперимент по влиянию концентрации редокс-медиатора ГЦФ

на изменение электрохимического сигнала системы. Для этого использовалась концентрация раствора ГЦФ 0,01 моль/л и варьировалась концентрация RBD-пробы. В каждом эксперименте регистрировалось изменение электрохимического сигнала после контакта с аптамером Apt31, после инкубации аптамера с RBD-пробой.

В таблице 13 отражены результаты измерения площади анодного и катодного пиков, полученные методом ЦВА при концентрации целевой RBD-пробы 0,33 мкмоль/л.

Таблица 12 – Результаты измерения площади пиков на ЦВА чистого электрода, после контакта с аптамером Apt31, после инкубации с RBD-пробой ~0,33 мкмоль/л, при концентрации ГЦФ 0,025 моль/л

S_a , мкКл			S_k , мкКл		
Чистый	Apt31	Apt31+RBD	Чистый	Apt31	Apt31+RBD
2,7	2,8	2,4	-2,3	-3,4	-3,1
2,7	2,8	2,4	-2,3	-3,4	-3,2
2,6	2,7	2,3	-2,3	-3,4	-3,1
Среднее значение					
2,7	2,8	2,4	-2,3	-3,4	-3,1
Коэффициент заполнения			Коэффициент заполнения		
–	4%		–	50%	
Прирост параметра			Прирост параметра		
–	–	14%	–	–	8%

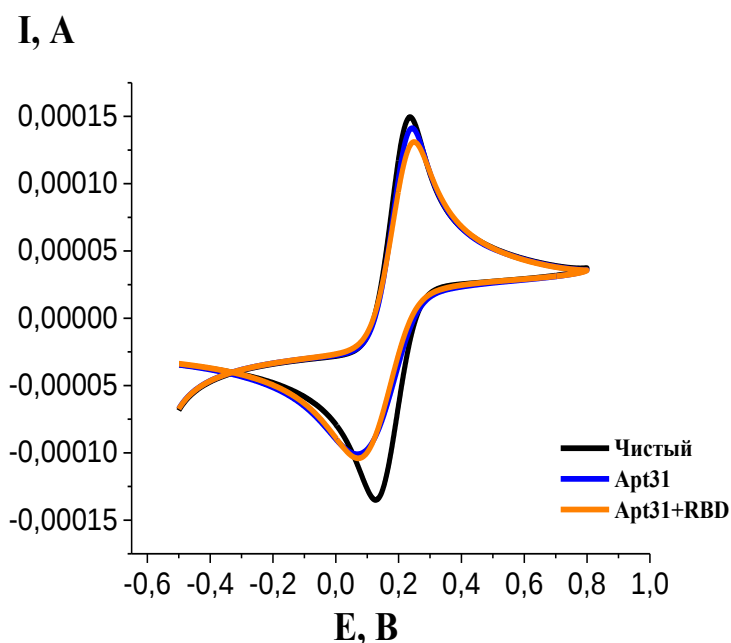


Рисунок 17 – Изменение электрохимического сигнала ЦВА после нанесения аптамера Apt31, после инкубации с RBD-пробой ~0,33 мкмоль/л (ГЦФ 0,025 моль/л)

При концентрациях ГЦФ 0,01 моль/л RBD 0,33 мкмоль/л наблюдается незначительное изменение прироста параметра для анодного пика 9%, для катодного 6% (Таблица 13). Изменение высоты пика и площади под пиком после инкубации с RBD-пробой на рисунке 18 практически не наблюдается.

В таблице 14 отражены результаты измерения площади пиков, полученные методом ЦВА при концентрации целевой RBD-пробы 0,0044 мкмоль/л.

Таблица 13 – Результаты измерения площади пиков на ЦВА чистого электрода, после контакта с аптамером Apt31, после инкубации с RBD-пробой ~0,33 мкмоль/л, при концентрации ГЦФ 0,01 моль/л

S _а , мкКл			S _к , мкКл		
Чистый	Apt31	Apt31+RBD	Чистый	Apt31	Apt31+RBD
2,9	1,0	0,9	-1,6	-0,2	-0,2
3,1	1,4	1,3	-1,5	-0,4	-6,0
1,9	0,9	6,4	-1,4	-0,3	-0,4
Среднее значение					
2,6	1,1	1,2	-1,5	-0,30	-0,28
Коэффициент заполнения			Коэффициент заполнения		
–	60%		–	80%	
Прирост параметра			Прирост параметра		
–	–	9%	–	–	6%

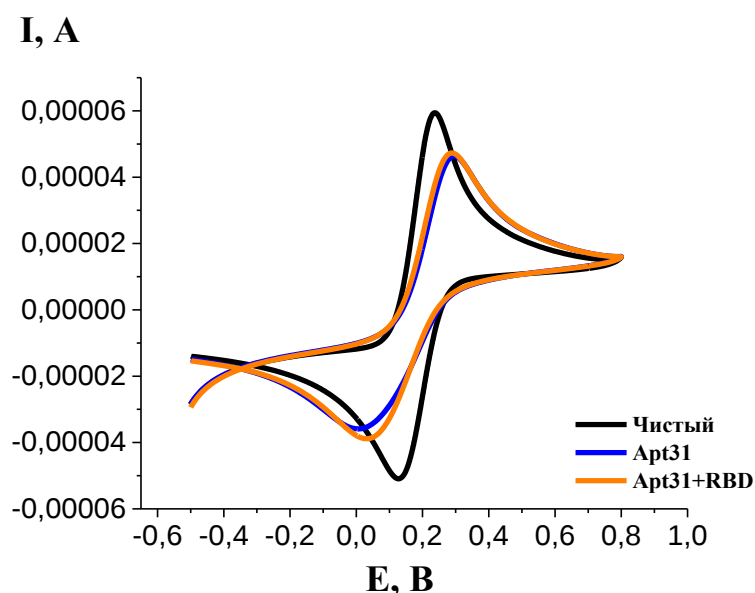


Рисунок 18 – Изменение электрохимического сигнала ЦВА после нанесения аптамера Apt31, после инкубации с RBD-пробой ~0,33 мкмоль/л (ГЦФ 0,01 моль/л)

При концентрациях ГЦФ 0,01 моль/л RBD 0,0044 мкл/л наблюдается значительный прирост параметра 20% и 30% для анодного и катодного пика соответственно (Таблица 14). Также на рисунке 19 стоит заметить существенное снижение высоты катодного и анодного пиков, а также уменьшение площади под пиками.

Полученные результаты на рисунке 20 позволяют оценить оптимальную концентрацию как редокс-медиатора ГЦФ, так и RBD для получения наиболее информативного сигнала (наибольшего прироста параметра) в электрохимической системе при прочих фиксированных условиях.

Таблица 14 – Результаты измерения площади пиков на ЦВА чистого электрода, после контакта с аптамером Apt31, после инкубации с RBD-пробой ~0,0044 мкмоль/л, при концентрации ГЦФ 0,01 моль/л

S _a , мкКл			S _к , мкКл		
Чистый	Apt31	Apt31+RBD	Чистый	Apt31	Apt31+RBD
1,9	1,8	1,1	-2,4	-1,5	-1,0
1,9	1,9	1,6	-2,7	-1,4	-17,3
2,0	1,6	1,4	-2,8	-1,4	-0,9
Среднее значение					
1,9	1,8	1,4	-2,6	-1,4	-1,0
Коэффициент заполнения			Коэффициент заполнения		
–	10%		–	50%	
Прирост параметра			Прирост параметра		
–	–	20%	–	–	30%

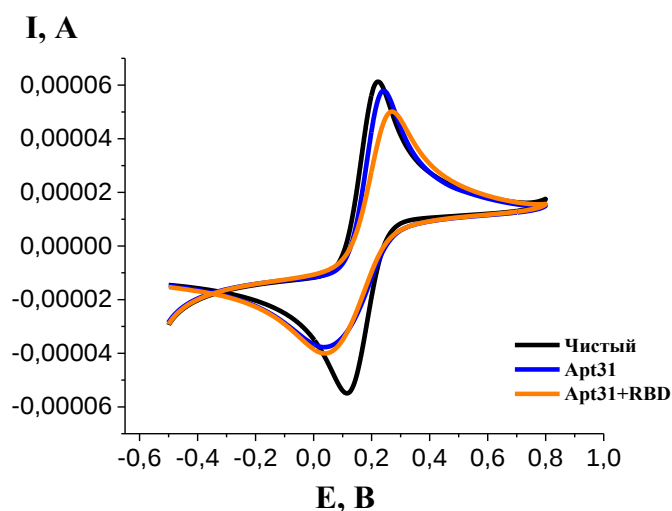


Рисунок 19 – Изменение электрохимического сигнала ЦВА после нанесения аптамера Apt31, после инкубации с RBD-пробой ~0,0044 мкмоль/л (ГЦФ 0,01 моль/л)

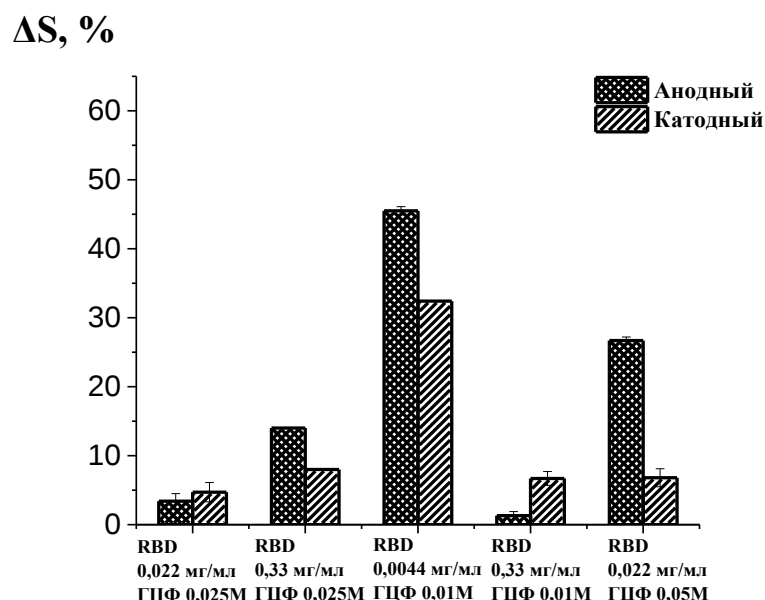


Рисунок 20 – Диаграмма изменения величин прироста площади анодного и катодного пиков после инкубации с RBD-пробой в зависимости от концентрации ГЦФ и RBD-пробы

В соответствии с диаграммой (Рисунок 20) следует отметить следующую зависимость – при одновременно низких концентрациях RBD и редокс-медиатора ГЦФ наблюдается максимальный прирост параметра. Этот момент требует дальнейших исследований, которые выходят за рамки данной дипломной работы. В данном случае, для дальнейших исследований была выбрана концентрация редокс-медиатора ГЦФ 0,025 моль/л, так как реальная концентрация RBD в пробах слюны может сильно варьироваться.

На следующем этапе проводились исследования на реальных объектах, которые представляют собой смывы проб слюны после ПЦР-теста ковид-положительных и ковид-отрицательных кандидатов.

3.6 Эксперимент по изменению электрохимического сигнала в присутствии проб здоровых и больных COVID-19 кандидатов

3.7 Эксперимент по изменению электрохимического сигнала в присутствии искусственной слюны

3.8 Выбор параметра для разделения проб здоровых и больных кандидатов

3.9 Проверочный эксперимент с зашифрованными пробами

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы были изготовлены аптасенсоры с аптамером, специфичным к S-белку RBD-домена. Полученные аптасенсоры продемонстрировали достаточно высокую воспроизводимость значений заполнения поверхности электрода, а именно площади $6,8 \pm 1,8$ мкКл (дисперсия составила $1,3 \times 10^{-5}$ мкКл) для анодного пика $6,4 \pm 2,2$ мкКл (дисперсия составила $1,9 \times 10^{-5}$ мкКл) для катодного пика.

Было оценено влияние двух составляющих электрохимической системы, а именно концентрации целевой RBD-пробы и концентрации редокс-медиатора ГЦФ на регистрируемый сигнал. Эксперимент показал, что при одновременно низких концентрациях ГЦФ и RBD-пробы наблюдается максимальный прирост целевого параметра.

Также были проведены эксперименты с реальными объектами, а именно со смывами проб слюны после ПЦР-теста здоровых и больных COVID-19 кандидатов. Установили, что разделение кандидатов на здоровых и больных COVID-19 возможно с применением изготовленного аптасенсора и метода ДИВА. В качестве аналитического сигнала был выбран прирост площади под пиком на вольтамперограмме после контакта аптасенсора с пробой. Таким образом выделили два диапазона прироста площади: область 33-43% для отрицательных проб и область 45-59% для положительных проб.

Кроме того, было изучено мешающее влияние человеческого альбумина, присутствующего в слюне, на регистрируемый сигнал. Было установлено, что человеческий альбумин не мешает определению присутствия целевого белка в пробе слюны, так как значения прироста площади пика для альбумина были в диапазоне от 3% до 33%.

В завершение работы был проведен проверочный эксперимент с пятью зашифрованными пробами. Однако, только 2 пробы из 5 были определены верно. Это вероятнее всего связано с низкой (местами – следовой) концентрацией RBD в смывах проб слюны, а также с применением для экспериментов размороженных проб слюны после длительного хранения и транспортировки. Предположительно оптимизация условий проведения измерений и использование более свежих проб для анализа позволит улучшить результаты.

В целом можно заключить, что электрохимический аптасенсор на основе аптамера Apt31 потенциально может применяться для диагностики COVID-19 по человеческой слюне с применением метода ДИВА. Он позволяет отделить пробы здоровых и больных COVID-19 кандидатов по величине прироста площади под пиком на вольтамперограмме

после контакта аптасенсора с пробой. Для улучшения результатов и разработки эффективного аптасенсора необходима дополнительная оптимизация параметров измерений и использование более качественного биологического материала.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ И ИСТОЧНИКОВ

1. Mahshid S. S. The Potential Application of Electrochemical Biosensors in the COVID-19 : Pandemic: A Perspective on the Rapid Diagnostics of SARS-CoV-2 / S. S. Mahshid, S. E. Flynn, S. Mahshid // Biosens Bioelectron. – 2021. – Vol. 176, № 112905. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566320308903?via%3Dihub> (access date: 12.03.2023).
2. An Integrated IoT-Wi-Fi Board for Remote Data Acquisition and Sharing from Innovative Immunosensors. Case of Study: Diagnosis of Celiac Disease / M. Giannetto, V. Bianchi, S. Gentili [et al.] // Sens Actuators B: Chemical. – 2018. – Vol. 273. – P. 1395–1403.
3. A Self-Calibrating IoT Portable Electrochemical Immunosensor for Serum Human Epididymis Protein 4 as a Tumor Biomarker for Ovarian Cancer / V. Bianchi, M. Mattarozzi, M. Giannetto [et al.] // Sensors (Basel). – 2020. – Vol. 20 (7). – P. 2016. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7180438/> (access date: 15.02.2023).
4. Reduced Neutralization of SARS CoV-2 Omicron Variant by Vaccine Sera and Monoclonal Antibodies / A. Wilhelm, M. Widera, K. Grikscheit [et al.] // med Rxiv. – 2021. – URL: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2021.12.07.21267432v4.full-text> (access date: 12.03.2023).
5. Waning of BNT162b2 Vaccine Protection against SARS-CoV-2 Infection in Qatar / H. Chemaitelly, P. Tang, M. R. Hasan [et al.] // The New England Journal of Medicine. – 2021. – Vol. 385, № e83. – URL: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa2114114> (access date: 10.03.2023).
6. Nanodiagnostics to Face SARS-CoV-2 and Future Pandemics: From an Idea to the Market and Beyond / G. Rosati, A. Idili, C. Parolo [et al.] // ACS Nano. – 2021. – Vol. 15 (11). – P. 17137–17149. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8565461/> (access date: 25.03.2023).
7. Diagnostic testing and screening for SARS-CoV-2 // Re-open EU and European Centre for Disease Prevention and Control. – [S. l.], 2022. – URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/covid-19/latest-evidence/diagnostic-testing> (access date: 12.03.2023).
8. Morales-Narváez E. The Impact of Biosensing in a Pandemic Outbreak: COVID-19 / E. Morales-Narváez, C. Dincer // Biosens Bioelectron. – 2020. – Vol. 163, № 112274. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7202811/> (access date: 25.03.2023).
9. The Vision of Point-of-Care PCR Tests for the COVID-19 Pandemic and Beyond / H. Zhu, H. Zhang, S. Ni [et al.] // Trends in Analytical Chemistry. – 2020. – Vol. 130, №

115984. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7369599/> (access date: 05.03.2023).

10. Point-of-Care COVID-19 Diagnostics Powered by Lateral Flow Assay / Y. Zhou, Y. Wu, L. Ding [et al.] // Trends in Analytical Chemistry. – 2021. – Vol. 145, № 116452. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34629572/> (access date: 15.02.2023).

11. Peeling R. W. Rolling out COVID-19 Antigen Rapid Diagnostic Tests: The Time Is Now / R. W. Peeling, P. Olliaro // Lancet Infectious Diseases. – 2021. – Vol. 21, is. 8. – P. 1052–1053.

12. Eissa S. Development of a Low-Cost CottonTipped Electrochemical Immunosensor for the Detection of SARSCoV-2 / S. Eissa, M. Zourob // Analytical chemistry. – 2021. – Vol. 93, is. 3. – P. 1826–1833.

13. Discovery of Aptamers Targeting the Receptor-Binding Domain of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein / Y. Song, J. Song, X. Wei [et al.] // Analytical chemistry. – 2020. – Vol. 92, is. 4. – P. 9895–9900.

14. Research priorities for COVID-19 sensor technology / A. Tong, T. C. Sorrell, A. J. Black [et al.] // Nature Biotechnology. – 2021. – Vol. 39, is. 2. – P. 144–147.

15. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2 / J. P. Broughton, X. Deng, G. Yu [et al.] // Nature Biotechnology. – 2020. – Vol. 38. – P. 870–874.

16. New challenges in point of care electrochemical detection of clinical biomarkers / S. Campuzano, M. Pedrero, P. Yanez-Sedeno, J. M. Pingarron // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2021. – Vol. 345. – № 130349. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925400521009175?via%3Dihub> (access date: 05.03.2023).

17. Emergence and spread of a SARS-CoV-2 lineage A variant (A.23.1) with altered spike protein in Uganda / D. L. Bugembe, M. V.-T. Phan, I. Ssewanyana [et al.] // Nature Microbiology. – 2021. – Vol. 6. – P. 1094–1101.

18. Wang J. Analytical Electrochemistry / J. Wang. – New York : Wiley, 2000. – Chapter 4 : Practical Considerations. – P. 100–139.

19. Structure- and Interaction-Based Design of Anti-SARS-CoV-2 Aptamers / V. Mironov, I. A. Shchugoreva, P. V. Artyushenko [et al.] // Chemistry A European Journal. – 2022. – Vol. 28, is. 12. – URL: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/chem.202104481> (access date: 05.03.2023).

20. Новые технологии создания средств диагностики и терапии на основе аптамеров / Т. Н. Замай, А. С. Замай, О. С. Коловская [и др.] // Сибирское медицинское обозрение. – 2012. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/novye-tehnologii-sozdaniya-sredstv-diaagnostiki-i-terapii-na-osnove-aptamero> (дата обращения: 05.04.2023).

21. In vitro selection of nucleic acid aptamers that bind proteins / R. C. Conrad, L. Giver, Y. Tian, A. D. Ellington // *Methods in Enzymology*. – 1996. – Vol. 267. – P. 336–367.
22. Groff K. Modern affinity reagents: Recombinant antibodies and aptamers / K. Groff, J. Brown, A. J. Clippinger // *Biotechnology Advances*. – 2015. – Vol. 33. – P. 1787–1798.
23. Гончарова Н. С. Получение высокоаффинных ДНК аптамеров – сенсорных элементов аналитической системы по выявлению кардиомаркера тропонина : выпускная бакалаврская работа / Н. С. Гончарова. – Красноярск, 2019. – 56 с. – URL: <http://elib.sfu-kras.ru/handle/2311/126035?show=full> (дата обращения: 04.04.2023).
24. Patel D. J. Structure, recognition and discrimination in RNA aptamer complexes with cofactors, amino acids, drugs and aminoglycoside antibiotics / D. J. Patel, A. K. Suri // *Journal of Biotechnology*. – 2000. – Vol. 74. – P. 39–60.
25. Кульбачинский А. В. Методы отбора аптамеров к белковым мишеням // *Успехи биологической химии*. – 2006. – Т. 46. – С. 193–224.
26. Wilson D. S. In vitro selection of functional nucleic acids / D. S. Wilson, J. W. Szostak // *Annual Review Biochemistry*. – 1999. – Vol. 68. – P. 11–14.
27. Molecular Selection, Modification and Development of Therapeutic Oligonucleotide Aptamers / Y. Yu, C. Liang, Q. Lv and [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17 (3). – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4813219/> (access date: 05.03.2023).
28. Лахин А. В. Аптамеры: проблемы, пути их решения и перспективы / А. В. Лахин, В. З. Тарантул, Л. В. Генинг // *Acta Naturae*. – 2013. – Т. 5, № 14 (19). – С. 37–48.
29. Отбор аптамеров к маркеру различных заболеваний В2-микроглобулину методом CE SELEX / И. П. Харичкина, В. И. Панфилов, А. Ш. Жаббарова [и др.] // *Auditorium : электрон. науч. журн. / Курский государственный университет*. – 2016. – № 3 (11). – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/otbor-aptamero-v-k-markeru-razlichnyh-zabolevaniy-2-mikroglobulinu-metodom-ce-selex/viewer> (дата обращения: 04.04.2023).
30. Single-stranded DNA aptamers that bind differentiated but not parental cells: subtractive systematic evolution of ligands by exponential enrichment / C. Wang, M. Zhang, G. Yang [et al.] // *Journal of Biotechnology*. – 2003. – Vol. 102 (1). – P. 15–22.
31. Ellington A. D. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands / A. D. Ellington, J. W. Szostak // *Nature*. – 1990. – Vol. 346. – P. 818–822.
32. Tuerk C. Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: RNA Ligands to Bacteriophage T4 DNA Polymerase / C. Tuerk, L. Gold // *Science*. – 1990. – Vol. 249, is. 4968. – P. 505–510.

33. Rapid and sensitive multiplex detection of COVID-19 antigens and antibody using electrochemical immunosensor-/aptasensor-enabled biochips / Fuze Jiang, Zhen Xiao, Ting Wang [et al.] // *Chemical Communications*. – 2022. – Is. 52. – URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2022/cc/d2cc01598f> (access date: 05.03.2023).
34. Biosensors and Biodetection: Methods and Protocols: Electrochemical and Mechanical Detectors, Lateral Flow and Ligands for Biosensors / S. Tombelli, A. Bini, M. Minnuni, M. Mascini // *Methods in Molecular Biology*. – 2008. – Vol. 504. – P. 23–36.
35. Самособирающийся монослой – Self-assembled monolayer // ВикибриФ. – [Б. м.], 2021. – URL: https://ru.wikibrief.org/wiki/Self-assembled_monolayer (дата обращения: 04.03.2023).
36. Burke L. D. Generation of active surface states of gold and the role of such states in electrocatalysis / L. D. Burke, A. P. O'Mullane // *Journal of Solid State Electrochem.* – 2000. – Vol. 4 (5). – P. 285–297.
37. Carvalhal R. F. Polycrystalline Gold Electrodes: A Comparative Study of Pretreatment Procedures Used for Cleaning and Thiol Self-Assembly Monolayer Formation / R. F. Carvalhal, R. S. Freire, L. T. Kubota // *Electroanalysis*. – 2005. – Vol. 17 (14). – P. 1251–1259.
38. Аптамеры и их использование в биологии и медицине / В. В. Кушников, О. В. Митькевич, В. Н. Ураков, М. Д. Тер-Аванесян // *Успехи современного естествознания*. – 2013. – № 3. – С. 40–43.
39. Application of aptamers in diagnostics, drug-delivery and imaging / C. Chandola, S. Kalme, M. G. Casteleijn [et al.] // *Journal Biosciences*. – 2016. – Vol. 41 (3). – P. 535–561.
40. Cho E. J. Applications of aptamers as sensors / E. J. Cho, J-W. Lee, A. D. Ellington // *Annual Review of Analytical Chemistry*. – 2009. – Vol. 2. – P. 241–264.
41. Цифровые лекарства на основе аптамеров для диагностики и терапии социально-значимых заболеваний / О. С. Коловская, Т. Н. Замай, Г. С. Замай [и др.] // *Сибирское медицинское обозрение*. – 2018. – № 1. – С. 5–14. – URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/tsifrovye-lekarstva-na-osnove-aptamero-v-dlya-diagnostiki-i-terapii-sotsialno-znachimyh-zabolevaniy/viewer> (дата обращения: 14.02.2023).
42. Жебентяев А. И. Электрохимические методы анализа / А. И. Жебентяев, А. К. Жерносек, И. Е. Талуть. – Витебск : [ВГМУ], 2016. – 106 с.
43. Будников Г. К. Основы современного электрохимического анализа / Г. К. Будников, В. Н. Майстренко, М. Р. Вяселев. – М. : Мир : Бином ЛЗ, 2003. – 592 с.

44. Аналитическая химия. Физические и физико-химические методы анализа : учебник для вузов / А. Ф. Жуков, И. Ф. Колосова, В. В. Кузнецов [и др.] ; под ред. О. М. Петрухина. – М. : Химия, 2001. – 496 с.
45. Липин В. А. Физическая химия. Электрохимия : учеб. пособие / В. А. Липин, А. И. Смирнова, Т. А. Сустановова. – СПб. : СПб. гос. ун-т промышленных технологий и дизайна, 2020. – 95 с.
46. Сраго И. А. Основы электрохимии : текст лекций / И. А. Сраго, Г. С. Зенин. – СПб. : СЗТУ, 2005. – 39 с.
47. Электрохимия / Ф. Миомандр, С. Садки, П. Одебер, Р. МеаллеРено. – М. : Техносфера, 2008. – 360 с.
48. Краснов К. С. Физическая химия : в 2 кн. / К. С. Краснов. – 3-е изд. – М. : Высш. шк., 2001. – Кн. 2 : Электрохимия. Химическая кинетика и катализ. – 319 с.
49. Основы электрохимических методов анализа / И. И. Жерин, Г. Н. Амелина, А. Н. Страшко, Ф. А. Ворошилов. – Томск : Изд-во Том. политехн. ун-та, 2013. – Ч. 1. – 101 с. – URL: https://portal.tpu.ru/SHARED/a/AMELINA/rabota/Tab/Fundamentals_of_Electrochemical_Methods_of_Analysis_Part.pdf (дата обращения: 18.03.2023).
50. Инверсионная вольтамперометрия : учеб.-метод. пособие по курсу «Аналитическая химия и физико-химические методы анализа» / В. И. Кочеров, А. Н. Козицина, А. В. Иванова, В. Г. Бурындин. – Екатеринбург : УрФУ, 2010. – 108 с.
51. Будников Г. К. Основы современного электрохимического анализа / Г. К. Будников, М. Р. Вяселев, В. Н. Майстренко. – М. : Мир, 2003. – 592 с.
52. Отто М. Современные методы аналитической химии : в 2 т. / М. Отто. – М. : Техносфера, 2003. – Т. 1. – 416 с.
53. Электрохимические методы анализа : учеб. пособие / А. Н. Козицина, А. В. Иванова, Ю. А. Глазырина [и др.]. – Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та, 2017. – 128 с.
54. Embedded 32-bit Differential Pulse Voltammetry (DPV) Technique for 3-electrode Cell Sensing / N. Z. N. Aqmar, W. F. H. Abdullah, Z. M. Zain, S. Rani // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. 6th International Conference on Electronic Devices, Systems and Applications 2017 (ICEDSA 2017), Kuching, Sarawak, 7–8 August 2017. – Kuching, Sarawak, 2017. – Vol. 340. – URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/340/1/012016/pdf> (access date: 05.03.2023).
55. Хенце Г. Полярография и вольтамперометрия. Теоретические основы и аналитическая практика / Г. Хенце ; пер. с нем. А. В. Гармаша, А. И. Каменева. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2008. – 284 с.

56. Электроаналитические методы. Теория и практика / под ред. Ф. Шольца ; пер. с англ. под ред. В. Н. Майстренко. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2006. – 326 с.
57. Плэмбек, Дж. Электрохимические методы анализа / Дж. Плэмбек ; пер. с англ. Б. Г. Кахана. – М. : Мир, 1985. – 496 с.
58. Harvey D. Modern analytical chemistry / D. Harvey. – Boston [et al.] : McGraw Hill, 2000. – 816 p. – URL: [https://gtu.ge/Agro-Lib/Harvey%20D.%20Modern%20analytical%20chemistry%20\(MGH,%202000\)\(816s\).pdf](https://gtu.ge/Agro-Lib/Harvey%20D.%20Modern%20analytical%20chemistry%20(MGH,%202000)(816s).pdf) (access date: 05.03.2023).
59. Rouessac F. Chemical analysis: modern instrumentation and methods and techniques / F. Rouessac, A. Rouessac. – 2nd ed. – Chichester : John Wiley&Sons, Ltd., 2007. – 586 p. – URL: https://ibf.iuh.edu.vn/wp-content/uploads/2019/10/Rouessac_Chemical-Analysis-Modern-Instrumentation-Methods-and-Techniques-2nd-ed.pdf (access date: 05.03.2023).
60. Wang J. Analytical electrochemistry / J. Wang. – 2nd ed. – New York [et al.] : Wiley VCH, 2000. – 16 p. – URL: <https://catalogimages.wiley.com/images/db/pdf/0471282723.pdf> (access date: 05.03.2023).
61. An Embedded Processing of Differential Pulse Voltammetry (DPV) Data Using ARM processor (LPC1768) / M. Amin, M. Isa, R. Mohd, Nor azah Yusof // Conference: 2015 IEEE International Circuits and Systems Symposium (ICSyS). – [S. l.], 2015. – P. 80–84.
62. Veloso A. J. Electrochemical detection of perchloroethylene using differential pulse voltammetry / A. J. Veloso, R. R. Fulthorpe, K. Kerman // Electrochemistry Communications. – 2013. – Vol. 37. – P. 28–31.
63. Wang J. Analytical Electrochemistry / J. Wang. – 2nd ed. – New York : Wiley, 2000. – 209 p.
64. Bard A. J. Electrochemical Methods : Fundamentals and Applications / A. J. Bard, L. R. Faulkner. – New York : Wiley, 1980. – 718 p.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Техника безопасности

Работа в химической лаборатории может быть потенциально опасна для жизни человека. Многие вещества являются ядовитыми, огнеопасными и взрывоопасными, что может нанести ущерб при несоблюдении техники безопасности. Большая часть несчастных случаев связаны именно с невнимательностью и небрежностью работающих. Однако, вероятность несчастных случаев можно минимизировать при соблюдении установленных правил безопасности.

— Общие правила техники безопасности:

1. Для работы в лаборатории необходимо иметь специальную одежду (халат, резиновые перчатки и защитные очки);
2. Волосы должны быть собраны в пучок, чтобы они не попадали в химические реагенты или оборудование;
3. Необходимо ознакомиться с правилами пожарной безопасности;
4. Строго запрещено употреблять пищу или жидкость непосредственно в лаборатории;
5. Необходимо своевременно и безопасно утилизировать химические отходы;
6. Рекомендуется работать в паре или с более опытным коллегой.

— При работе с химической посудой и лабораторным оборудованием следует обращать внимание на следующие пункты:

- Необходимо проверять химическую посуду на наличие повреждений и трещин перед использованием;
- Важно использовать только ту посуду, которая соответствует методике эксперимента;
- Нужно обращать внимание на температурный режим нагрева, который рекомендован для конкретной посуды;
- Запрещается выливать отходы химического процесса в раковину без предварительной нейтрализации;
- После использования необходимо тщательно вымыть посуду и хранить ее в специальных шкафах, изолированных от других материалов.

А также следует соблюдать некоторые правила использования и хранения реактивов:

- Хранение реактивов положено в местах, где они будут защищены от прямых солнечных лучей и перегрева;
- Химические вещества необходимо хранить в герметичных контейнерах;
- Важно следить за сроками годности реактивов;
- Необходимо использовать средства индивидуальной защиты (халат, защитные очки, защитные перчатки) при работе с химическими реактивами;
- В случае возгорания или утечки, нужно немедленно сообщить об этом своему начальнику или пожарной команде.

Здоровье сбережение

При выполнении химического эксперимента необходимо проявлять осторожность и внимательность для того, чтобы не подвергать риску своё здоровье.

— Соблюдение простых правил может сохранить жизнь:

1. Носите защитную одежду, включая халат, резиновые перчатки и защитные очки;
2. Соблюдайте правильный порядок добавления реагентов и не мешайте состав с другими химическими веществами;
3. Перед использованием реагентов и оборудования ознакомьтесь с техникой выполнения работы;
4. Не пробуйте реагенты и не вдыхайте пары;
5. Используйте только чистые стеклянные приборы;
6. Никогда не добавляйте воду к кислотам, добавляйте кислоту к воде медленно и осторожно;
7. Никогда не поднимайте стеклянные приборы над головой;
8. После окончания эксперимента тщательно промойте приборы и очистите рабочую поверхность.

Следуя этим базовым правилам безопасности, можно значительно снизить вероятность происшествий в лаборатории и гарантированно защитить себя и своих коллег. Никогда не стоит игнорировать правила техники безопасности, даже если задача строго определенная или кажется безопасной.

Здоровье и безопасность колоссально важны для каждого!

СПРАВКА

Томский Государственный Университет

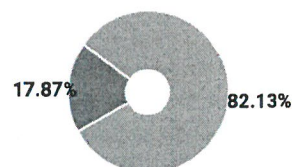
о результатах проверки текстового документа
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.ВУЗ

Автор работы: Прокопьева Вероника Алексеевна
Самоцитирование
рассчитано для: Прокопьева Вероника Алексеевна
Название работы: Диплом_Прокопьева_В.А.
Тип работы: Не указано
Подразделение:

РЕЗУЛЬТАТЫ

СОВПАДЕНИЯ		17.87%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ		82.13%
ЦИТИРОВАНИЯ		0%
САМОЦИТИРОВАНИЯ		0%



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 15.06.2023

Структура
документа:

Проверенные разделы: основная часть с.2, 5-58

Модули поиска:

ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс*; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика; Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Переводные заимствования издательства Wiley; eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ: аналитика; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Медицина; Диссертации НББ; Коллекция НБУ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика; Перефразирования по Интернету; Перефразирования по Интернету (EN); Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте; Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте; Перефразирования по коллекции

Работу проверил: Мишенина Людмила Николаевна

ФИО проверяющего

Дата подписи:

16.06.2023

ЗАМ ДЕКАНА ХФ ПО УР
ШЕЛКОВНИКОВ В В

Подпись проверяющего



Чтобы убедиться
в подлинности справки, используйте QR-код,
который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование
корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего.
Предоставленная информация не подлежит использованию
в коммерческих целях.