

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Сибирский федеральный университет

Российская академия наук
Сибирское отделение
Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр»
Институт физики им. Л. В. Киренского

ЕНИСЕЙСКАЯ ФОТОНИКА – 2020

Первая Всероссийская научная конференция
с международным участием

тезисы докладов

14 – 19 сентября 2020 г.

Красноярск
2020

ОПТИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ НА ЭЛЕКТРОДАХ

А. М. Евдокимова¹, А. В. Шабалина^{1*}, В. А. Светличный¹, И. Н. Лапин¹

¹*Томский государственный университет
634050, Российская Федерация, Томск, пр. Ленина, д. 36
E-mail: shabalinaav@gmail.com

Состав и структура слоя биораспознающих молекул на поверхности электрода являются одними из определяющих факторов в прогнозе эффективности работы электрохимических биосенсоров. Для контроля воспроизводимости и стабильности работы биосенсоров, необходима разработка новых или усовершенствование уже существующих методов характеристики биологических слоев на твердых поверхностях. В данной работе с использованием метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии проводилась визуализация слоев ДНК-аптамеров (одноцепочечных молекул ДНК), способных специфически связываться с белками-онкомаркерами рака легкого, на поверхности золотых дисковых электродов.

Биосенсоры – сенсоры, содержащие в своем составе биологические распознающие компоненты, позволяющие специфически обнаруживать присутствие целевых определяемых объектов (простых веществ, сложных органических и биологически активных веществ, цельных клеток, бактерий, вирусов и т. д.) в анализируемой пробе (газ, жидкость, твердое тело, вода, кровь, выдыхаемый воздух и т. д.). В зависимости от природы детектора, лежащего в основе сенсора, биосенсоры могут быть оптическими, пьезоэлектрическими, гравиметрическими и т. п. Электрохимические биосенсоры представляют собой систему электродов, находящуюся в контакте с биологическим распознающим компонентом. Чаще всего, распознающий биоконтакт химически связывается с поверхностью индикаторного электрода, на котором формируется отклик и с которого регистрируется сигнал электрохимического биосенсора.

Электрохимический отклик системы крайне чувствителен к состоянию границы раздела электрод/раствор электролита (жидкость, которой наполняется ячейка с электродами). Изменение состояния слоя распознающих биомолекул на поверхности электрода до и после контакта с определяемыми объектами фиксируется по изменению отклика электрода.

Для получения полезного сигнала электрохимического биосенсора, необходимо обеспечить получение воспроизводимого и стабильного слоя распознающих биомолекул на поверхности индикаторного электрода. Оценку воспроизводимости и стабильности получаемого слоя, в основном, проводят косвенными методами – по измерению площади электроактивной поверхности электрода (например, в [1]) и оценке блокировки его поверхности (например, в [2]) или по изменению сопротивления переноса заряда на границе раздела электрод/электролит (например, в [1]) после формирования слоя биомолекул. Однако, косвенные методы, позволяя оценить долю заполнения поверхности электрода, не способны дать достаточно полную информацию о составе и структуре получаемого слоя. Чаще всего для получения визуальной информации о формирующемся слое биомолекул используют атомно-силовую микроскопию (АСМ) [3]. Этот метод имеет достаточно высокое разрешение и может позволить видеть отдельные крупные молекулы на поверхности электрода. Однако, его применение ограничено, так как на качество получаемого сигнала сильное влияние оказывает среда. При высушивании или при помещении в неподходящую среду, биомолекулы могут разрушиться или потерять свою рабочую конформацию, нарушив тем самым структуру всего слоя. По этой причине, регистрация визуальной информации должна проводиться в жидкости – в водных растворах, позволяющих биомолекулам сохранять свою «рабочую» форму. Поэтому, привлечение, например, электронной микроскопии, требующей вакуумирования, неприемлемо, а применение АСМ довольно сильно ограничено.

Нами впервые было предложено применение метода конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (confocal laser scanning microscopy, CLSM) для визуализации

биослоёв на поверхности индикаторных электродов [4, 5]. Основной задачей подбора условий регистрации изображений данным методом заключается в определении области спектра, включающей наиболее интенсивную полосу автофлуоресценции биообъекта или флуоресценции метки, связанной с изучаемыми биомолекулами. Сложной задачей является визуализации двухкомпонентных слоёв. В случае слабо интенсивной автофлуоресценции, эта задача становится еще более трудной.

В данной работе с использованием метода CLSM проводилась визуализация слоев ДНК-аптамеров (одноцепочечных молекул ДНК), специфичных к онкомаркерам рака легкого, на поверхности золотых дисковых электродов. Исследовались слои двух аптамеров LC-17 и LC-18 из серии разработанных ранее научной группой из КрасГМУ под руководством Кичкайло А.С. [6] и способных специфически связываться с опухолевыми маркерами рака легкого. Было обнаружено, что один из аптамеров обладает автофлуоресценцией достаточно сильной, чтобы служить самостоятельным сигналом для визуализации слоя с привлечением метода CLSM. При возбуждении лазером с длиной волны 405 нм, максимум автофлуоресценции LC-18 находится в достаточно широкой области 415-464 нм. При визуализации получаемого сигнала можно наблюдать распределение слоя ДНК-аптамера LC-18 на поверхности золотого дискового электрода. Однако, аптамер LC-17 имеет слабую интенсивность автофлуоресценции при тех же условиях, что не позволяет достоверно обнаружить его присутствие на поверхности электрода.

Таким образом, в случае с ДНК-аптамером LC-17 необходимо дополнительно модифицировать молекулы аптамера флуоресцентными метками, чтобы стала возможной визуализация его слоя на поверхности электрода. В этом случае необходимо будет убедиться, что введенный модификатор (метка) не влияет на конформацию молекулы аптамера и не будет снижать (или напротив, повышать) его способность связываться с поверхностью электрода. Кроме того, введение дополнительного агента в состав биомолекулы может повлиять на межмолекулярные латеральные взаимодействия в аптамерной «пленке», что скажется на структуре получаемого биораспознающего слоя. Оценку возможности таких изменений при введении флуоресцентной метки необходимо проводить с привлечением других методов, в том числе – оптических, электрохимических. Данные исследования запланированы к проведению в ближайшем будущем.

Список литературы

1. M. Mazloum-Ardakani, B. Barazesh, M. Mazloum-Ardakani. A distinguished cancer-screening package containing a DNA sensor and an aptasensor for early and certain detection of acute lymphoblastic leukemia // *Clinica Chimica Acta*, vol. 497, pp. 41–47, 2019.
2. M. Tertis, P.I. Leva, D. Bogdan, et al. Impedimetric aptasensor for the label-free and selective detection of Interleukin-6 for colorectal cancer screening // *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 137, pp. 123–132, 2019.
3. C. Ibañeta, M.K. Md Arshad, S.C.B. Gopinatha, et al. Gold interdigitated triple-microelectrodes for label-free prognosticative aptasensing of prostate cancer biomarker in serum // *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 136, pp. 118–127, 2019.
4. A.V. Shabalina, D.O. Sharko, I.N. Lapin. Visualization of the effectiveness of the surface blocking of electrochemical sensors using laser confocal microscopy // *Proc. of SPIE*. 11322. doi:10.1117/12.2550777.
5. I.N. Lapin, A.V. Shabalina, V.A. Svetlichnyi, et al. Visualization of Nanoconstructions with DNA-Aptamers for Targeted Molecules Binding on the Surface of Screen-Printed Electrodes // *Proceedings SPIE*. 2018, 10614. doi:10.1117/12.2304745.
6. G.S. Zamay, T.I. Ivanchenko, T.N. Zamay, et al. DNA Aptamers for the Characterization of Histological Structure of Lung Adenocarcinoma // *Molecular Therapy–Nucleic Acids*, vol. 6, pp. 150–162, 2017.