

Национальный исследовательский Томский политехнический университет
Национальный исследовательский Томский государственный университет
Томский государственный архитектурно-строительный университет
Томский государственный университет систем управления и радиоэлектроники
Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ НАУК

Сборник научных трудов
XIV Международной конференции студентов, аспирантов
и молодых ученых

Том 2. Химия

РОССИЯ, ТОМСК, 25 – 28 апреля 2017 г.

PROSPECTS OF FUNDAMENTAL SCIENCES DEVELOPMENT

XIV International Conference of students, graduate students
and young scientists

Volume 2. Chemistry

RUSSIA, TOMSK, April 25– 28, 2017

Томск 2017

**ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПЛАНАРНЫХ
ГРАФИТОВЫХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БЕЛКОВ-ОНКОМАРКЕРОВ**

К.А. Рыжинская¹, А.В. Шабалина²

Научный руководитель: к.ф.-м.н. В.А. Светличный²

¹ Томский политехнический университет, Россия, г. Томск, пр. Ленина, 30, 634050

²Томский государственный университет, Россия, г. Томск, пр. Ленина, 36, 634050

E-mail: kab16@tpu.ru

**MODIFIED SCREEN-PRINTED CARBON ELECTRODES APPLICATION FOR PROTEIN TUMOR
MARKERS DETERMINATION**

K.A. Ryzhinskaya¹, A.V. Shabalina²

Scientific Supervisor: Ph.D. V.A. Svetlichnyi²

¹Tomsk Polytechnic University, Russia, Tomsk, Lenin str., 30, 634050

²Tomsk State University, Russia, Tomsk, Lenin str., 36, 634050

E-mail: kab16@tpu.ru

Annotation. Screen-printed carbon electrodes were modified with gold nanoparticles bound with DNA-aptamers by two different methods. Aptamers can selectively bind protein tumor markers from the blood plasma. The electrodes were tested. Signals obtained via square-wave voltammetry from modified electrodes covered with blood plasma of the healthy donors and donors with lung cancer can be distinguished.

Введение. Рак легкого регистрируется у более чем миллиона людей по всему миру и вызывает 25% всех смертей от рака [1]. На ранних стадиях рак легкого выявляется только в 27 случаях из 100. Клиническая диагностика нуждается в разработке чувствительных, селективных и экспрессных методов анализа, с помощью которых можно было бы диагностировать рак на I стадии заболевания.

Вольтамперометрические методы являются широко распространенными методами анализа и определения различных веществ в самых разнообразных объектах. Современным вариантом электрохимических датчиков служат планарные электроды, изготовленные методом трафаретной печати. Для повышения чувствительности, селективности анализа, а также создания специфического отклика, планарные электроды подлежат модифицированию, в том числе – биологическими молекулами (ферменты, антитела, рецепторы). К последним также относятся аптамеры – фрагменты одноцепочечной РНК или ДНК способные к специфическому связыванию молекул-мишеней [2]. Известны работы по диагностике раковых заболеваний с использованием аптамеров, специфичных к белкам онкомаркерам [3]. ДНК-аптамеры с тиоловыми концевыми группами могут осаждаться на поверхность золота, и известны датчики на основе золотых индикаторных электродов с ДНК-аптамерами [4].

В данной работе предлагается вместо золотых индикаторных электродов использовать более универсальные и дешевые графитовые (screen-printed carbon electrodes – SPCE), модифицированные золотыми наночастицами. Последние связываются с ДНК-аптамерами и при помещении на электрод могут давать сигнал о присутствии белков онкомаркеров в исследуемом объекте (плазме крови человека).

Материалы и методы исследования. Наночастицы золота были получены методом импульсной лазерной абляции объемной мишени в спиртовой или водной среде с использованием Nd:YAG лазера (1064 нм, 7 нс, 10 Гц). Модифицирование поверхности рабочего электрода проводили по методу описанному в [5]. Изображения поверхности электродов получены методом растровой электронной микроскопии на Vega 3, Tescan. Селекцию аптамеров к раковым тканям и оценка специфичности аптамеров к ткани рака легкого осуществляли сотрудники Красноярского государственного медицинского университета им. проф. Войно-Ясенецкого [3]. В данной работе нами были изучены аптамеры LC-29 и LC-2108. Для модифицирования поверхности углеродных планарных электродов золотыми наночастицами с ДНК-аптамерами предложено использовать два способа. Первый предполагает нанесение золотых наночастиц из спиртовой дисперсии на поверхность электрода и последующая иммобилизация ДНК-аптамеров на наночастицы (Способ 1). Второй способ заключается в предварительном связывании золотых наночастиц из водной дисперсии с ДНК-аптамерами и последующее нанесение на поверхность электрода (Способ 2). Квадратно-волновые вольтамперограммы снимали на Бипотенциостате $\mu 200$ (DropSens), с использованием планарных графитовых электродов RUSENS в 20 мМ буферном растворе Трис-ClO₄ с pH=8,6 с 2,5мМ K₃Fe(CN)₆ и 2,5мМ K₄Fe(CN)₆. Определение белков онкомаркеров проводили в подготовленных образцах плазмы крови больных и здоровых людей (всего 5 образцов). Сигналом служила разница величины пика тока в области 0,1 В (превращение Fe²⁺/Fe³⁺) на квадратно-волной вольтамперограмме (square-wave voltammograms – SWV) для модифицированного электрода, и пика тока для того же электрода после инкубации под образцом подготовленной плазмы крови.

Результаты. При нанесении аптамеров на осажденные на поверхности электрода золотые наночастицы (рисунок 1) можно отметить, что модификатор после высушивания (съемка производится в вакууме) присутствует в виде аморфных скоплений на агрегатах наночастиц. Если же наносить на поверхность электродов смесь аптамеров и наночастиц золота из водной дисперсии (рисунок 2), то наночастицы располагаются на поверхности и внутри аморфной массы аптамеров.

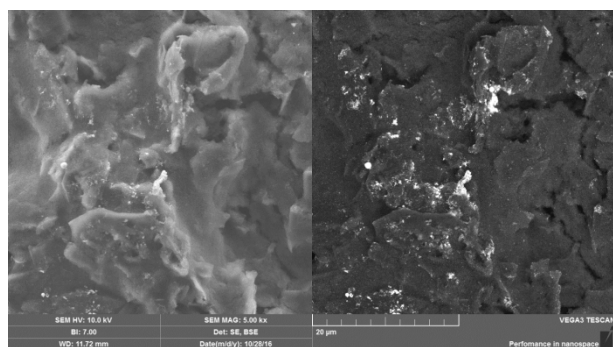


Рис. 1. РЭМ-изображения поверхности CSPE, модифицированного по Способу 1 (аптамер LC 2108)

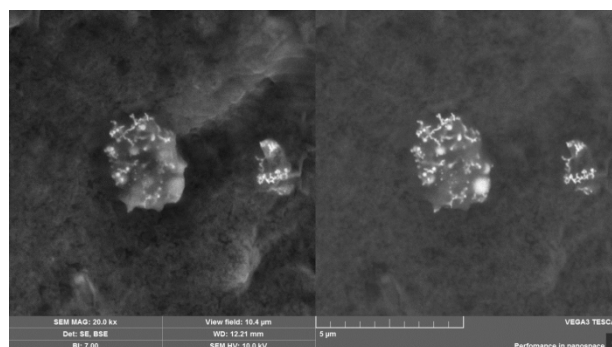


Рис. 2. РЭМ-изображение поверхности CSPE, модифицированного по Способу 2 (аптамером LC 2108)

*Слева изображение, полученное при детектировании вторичных электронов, справа – при детектировании обратно-отраженных электронов (z-контраст).

Пример вольтамперограмм, полученных для плазмы крови здорового и больного человека, приведен на рисунке 3. Величина тока аналитического пика различна. Обобщенные данные для двух

типов модифицирования и двух аптамеров приведены на рисунке 4. Во всех случаях, кроме одного, сигнал от здоровой крови выше сигнала от плазмы крови больного человека.

Таким образом, использование описанного модифицирования электродов позволяет разделить сигнал от плазмы крови здоровых и больных доноров. Планируется проведение более глубоких исследований описанных систем для выявления наиболее оптимальных условий модифицирования электродов, условий проведения анализа, а также для получения концентрационной зависимости сигнала от аналита.

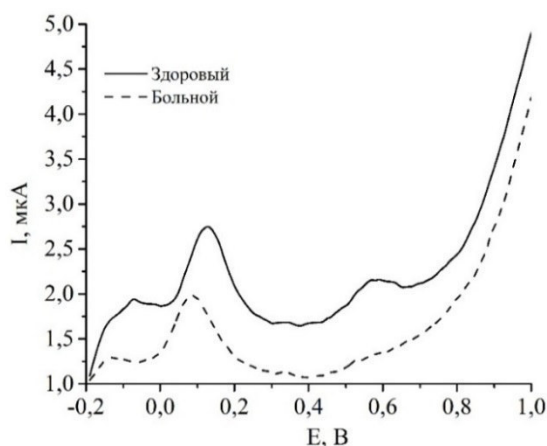


Рис. 3. SWV для CSPE, модифицированного LC 29, смешанным с наночастицами Au в трис-ClO₄ после инкубации с плазмой крови здорового и больного человека

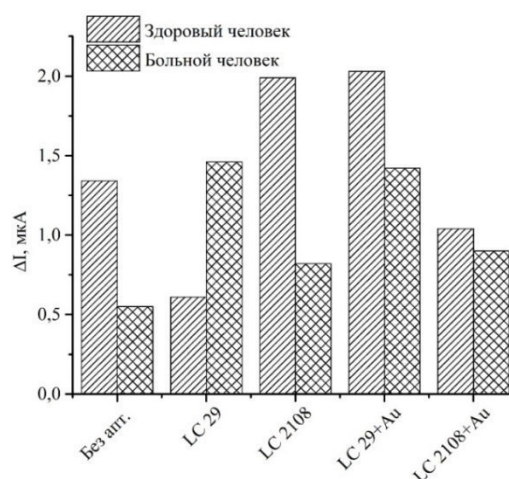


Рис. 4. Гистограмма значений разницы величин сигналов для модифицированных электродов до и после инкубации с плазмой крови больных и здоровых доноров.

*«Без апт.» – электрод, модифицированный наночастицами золота. «LC 29» и «LC 2108» – электроды, модифицированные по Способу 1. «LC 29+Au» и «LC 2108+Au» – электроды, модифицированные по Способу 2.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левченко Е.В. Скрининг рака легкого // Практическая онкология. – 2010. – №2. – С. 88–95.
2. Kulbachinskiy A.V. Methods for Selection of Aptamers to Protein Targets // Biochemistry (Moscow). – 2007. – V. 72. – №. 13. – P. 1505–1518.
3. Замай Т.Н., Замай Г.С., Замай А.С. Метод диагностики рака легкого человека с помощью одноцепочечных ДНК-олигонуклеотидов // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14. – № 5(2).
4. Malecka K., Stachyra A., Góra-Sochacka A., Sirko A. et al. Electrochemical genosensor based on disc and screen printed gold electrodes for detection of specific DNA and RNA sequences derived from Avian Influenza Virus H5N1 // Sensors and Actuators B: Chemical. – 2016. – V. 224. – P. 290–297.
5. Пат. 2541798 РФ. Способ приготовления модифицированных наночастицами металлов углеродсодержащих электродов для вольтамперометрического анализа органических соединений /А.В. Шабалина, В.А. Светличный, И.Н. Лапин, К.А. Белова. Заявлено 07.02.2014; Оpubл. 20.02.2015, Бюл. №5.