Наноаналитические и биосенсорные платформы для проведения иммуноанализа и определения активности ферментов

И.Н. Курочкин

Химический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, *e-mail: ikur@genebee.msu.su*

Ферменты – костяк метаболизма

- Ферменты самый крупный и наиболее специализированный класс белковых молекул
- Ферменты основа молекулярных механизмов реализации действия генов
- Ферменты катализируют тысячи химических реакций, из которых, в конечном счете, слагается клеточный обмен.
- Молекулярный полиморфизм ферментов существенным образом отражается на физиологическом статусе человека, особенностях его поведения, реакциях на внешние воздействия

Геномика и молекулярный полиморфизм человека

- Геном человека 32000 гена
- Аннотировано 15130 уникальных белковых структур
- Ферментов порядка 3000
- Ингибиторов 218
- Рецепторов 1467
- Белков-переносчиков 787



Бутирилхолинэстераза человека

Указаны места аминокислотных замен в результате единичных мутаций гена фермента





Современные высокопроизводительные методы изготовления электрохимических сенсоров

- Методы трафаретной печати (screen printing)
- Флексография







 Методы струйной печати (InkJet electronic)





Substrate

Планарные электроды





Трафаретная печать

Электроды

Сенсорные матрицы





Углеродные электроды

Пероксид чувствительные слои на основе наночастиц диокида марганца

- Potassium permanganate KMnO₄
- Manganese acetate (CH₃COO)₂Mn
- Bis(2-ethylenehexyl) sulfosuccinate Na (AOT)

 $3(CH_{3}COO)_{2}Mn \cdot 4H_{2}O + 2KMnO_{4} \rightarrow \underline{5MnO_{2}} + 2CH_{3}COOK + 4CH_{3}COOH + 2H_{2}O$

Проведение реакции в системе обращенных мицелл и в растворе (золи диоксида марганца, медиаторные чернила)

Медиаторные чернила



Пероксид чувствительные слои на основе наночастиц диокида марганца





б) последовательное определение
H2O2 (1 µM)

а) Стационарный отклик (H2O2 1 μM)

Аналитические характеристики пероксидчувствительного слоя

- -предел обнаружения по пероксиду водорода, рассчитанный по уравнению
- у=23.6·х-0.3 при уровне шума 0.3нА составил 4.5·10⁻⁸ М (3σ),
- -линейный диапазон 4.5·10⁻⁸-1.0·10⁻⁴ М,
- -чувствительность сенсора 377 ± 1 мА/(М·см²).

Технология «слой – за слоем» («layer – by –layer», LBL)

графитовый электрод



слой MnO₂

Tехнология «слой – за слоем» («layer – by –layer», LBL)

графитовый электрод



раствор поликатиона

Технология «слой – за слоем» («layer – by –layer», LBL)

графитовый электрод



отмывка

Tехнология «слой – за слоем» («layer – by –layer», LBL)

графитовый электрод



раствор полианиона

Tехнология «слой – за слоем» («layer – by –layer», LBL)

графитовый электрод



отмывка

Технология «слой – за слоем» («layer – by –layer», LBL)

графитовый электрод



и т.д.

АСМ изображения формируемых структур



0,05% PDDA, Images 2,5 x 2,5 mkm Adsorption from water (1), 50 mM PB (2), 50 mM PB and 0.1M NaCl (3), 50 mM PB and 1M NaCl (4)

4 слоя



40-nm silica $(12-nm SnO_2 / PDDA)_{18}$,(P.alternated with PDDAthicknessoin 6 bilayer film (210190 nmr

(PAH/glucose oxidase)₁₈ multilayer







Y. Lvov, K. Ariga, T. Kunitake, *Langmuir*, 1997, v.13, 6195-6203 "Alternate assembly of ordered multilayers of SiO2 and other nanoparticles and polyions"

Холиноксидазные сенсоры



Dubacheva G.V., Eremenko A.V., Kurochkin I.N., Nikitin I.P., Nikitina S.E., Sigolaeva L.V., Sokolovskaya L.G., Yaroslavov A.A. Sensing element for the analysis of bioactive compounds in solutions. // Useful model patent of The Russian Federation № 44483, priority – from 25.11.2004, registration – from 27.03.2005.

Предел обнаружения холина: **50 nM**

Линейность: 5·10⁻⁸ М – 5·10⁻⁴ М

Чувствительность: 0,52 A/(M·cm²)

Конструкция:



- MnO₂ + - PDDA - Холиноксидаза

Холиноксидазные сенсоры

Поверхность: графитовый стержень				
	Метод нанесения MnO ₂	Электрохимиче ское осаждение		
	Шероховатость слоя MnO ₂	54 7 нм		
-	Шероховатость пленки MnO ₂ /ПДДА	43,2 0,1 нм		
	Удельная площадь пленки MnO ₂ /ПДДА	1,03 0,01		

Поликатионы





Фермент: холиноксидаза (XO) pl=4,1



ПДДА –

Br

полидиметилдиаллиламмоний хлорид, референсный поликатион ПТМАЭМА – политриметиламиноэтилметакрилат иодид ПТМАЭМА₁₃₃– короткий линейный аналог ПТМАЭМА₁₄₀₀ – длинный линейный аналог

4

Новые конструкции



ChO

ChO

ChO





Метод нанесения MnO ₂	Нанесение капли коллоидного раствора MnO ₂
Шероховатость слоя MnO ₂	>1 мкм
Шероховатость пленки MnO ₂ /ПДДА	75,1 6,8 нм
Удельная площадь пленки MnO ₂ /ПДДА	1,38 0,01

За счет смены поверхности происходит увеличение активности пленки ПДДА/ХО в 2 раза

Ионный состав раствора полиэлектролита. Влияние аниона

ПДДА_{А-}/ХО



Модель формирования ферментполиэлектролитных пленок





Аналитические характеристики сенсорных покрытий

Конструкция	ПДДА/ХО	ПДДА+I ⁻ /XO	ПДДА+30 %EtOH/XO	(ПДДА/ХО)₅	(ПДДА+I ⁻ /XO) ₃	
Предел обнаружения	10 ⁻⁷	7,5·10⁻ ⁸	7,5·10⁻ ⁸	5·10 ⁻⁸	5·10 ⁻⁸	
Воспроизво- димость(RSD),%	4,1	3,7	4,4	4,1	5,8	
Стабильность, (∆ за одно измерение), %	-0,1±0,1	-0,1±0,1	-0,4±0,2	0,7±0,4	-1,0±1,3	
Чувствительность, А/(М·см²)	0,34	0,38	0,41	0,52	0,49	
Кинетические параметры ХО в пленках						
К _М ^{эфф.} 10 ⁻⁴ , М	7,5±0,4	6,4±0,8	5,9±1,2	4,8±1,4	6,7±1,3	
V _m ^{эфф} , мкА	7,5 ±0,1	9,7 ±0,2	8,8 ±0,2	12,9 ±0,4	12,9 ±0,5	

Тирозиназные сенсоры



[1] Dubacheva G.V. et al., Sensornie Sistemi, 2006. V. 20. № 4. P. 336-343.
[2] Dubacheva G.V. et al., Rossiiskie nanotekhnologii, 2007. V. 2. № 1-2. P. 154-159.
[3] Dubacheva G.V. et al., Nanotechnologies in Russia, 2008. V. 3. № 3–4. P. 221–227.

Сенсоры на основе алкогольоксидазы



Предел обнаружения: **40 µМ** Линейность:

Линеиность: 5·10⁻⁴ M – 5·10⁻³ M

Чувствительность: 0,47 mA/(с·M·cm²)

<u>Конструкция:</u>



Электрохимические сенсоры

Конструкция	Отн. Акт.
PDDA/Enzyme (control)	1.0
(PTMAEMA) ₆ /(PAA) ₅ /(PTMAEMA) ₆ /Alcohol oxidase	1.9
(PTMAEMA) ₆ /PBB/(PTMAEMA) ₆ /Alcohol oxidase	5.3



Окисленные мультистенные нанотрубки и наностержни



МСУНТ после окисления

Mw = 800000 г/моль

α(COOH) = 2.5%

МСУНТ любезно предоставленные зав. лаборатории Газовой электрохимии кафедры физической химии С.В. Савиловым, УНС любезно предоставленные Б.В. Пешневым (МИТХТ).

Использование окисленных нанотрубок и наностержней



Увеличение активности в 5-6 раз

Наноструктурированные сенсорные элементы для целей экологии и медицины

Экологический





Мониторинг процессов уничтожения химического оружия









Метод последовательного нанесения

ферментов и полиэлектролитов

 В Быстрый и полный биохимический анализ
 в режиме «у постели больного»



анализ ферментов крови – молекулярный полиморфизм человека

















Биосенсорные системы на основе C3M для определения крупных белковых антигенов



Kurochkin I.N., Chernov S.F., Pavelev A.B. Biosensor system based on atomic force microscopy. // In: Materials of The 3-d world congress on biosensors. New Orleans. 1994.

Анализ микробиологических объектов на основе лэнгмюровских пленок антител и сканирующей зондовой

микроскопии



Определение единичных комплексов антиген-антитело: высокочувствительный анализ белковых антигенов методами зондовой микроскопии

1,3 (φг)131301300



Биосенсорные системы на основе СЗМ

Полианион, поликатион





Возможные варианты проявляющих реакций

Группа ферментов	Субстраты
Пероксидазы, лакказы	Производные фенола, анилина, виниловые мономеры
Гликозилтрансферазы	Гликозилфосфаты
Гликозидазы	UDP-Glc, галогенпроизводные сахаров
Ацилтрансферазы	Ацил-СоА
Липазы	Лактоны

Ферментативное усиление



Проявление комплексов антиген-антитело на аффинной поверхности



Определение ТТГ



Благодарности

- А. Еременко
- Л. Сиголаева
- Д. Пергушов
- Е. Евтушенко
- И. Будашов
- Г. Дубачева

- Е. Донцова
- М. Порус
- М. Осипова
- А. Быконя
- А. Торгонская
- А. Бадалян