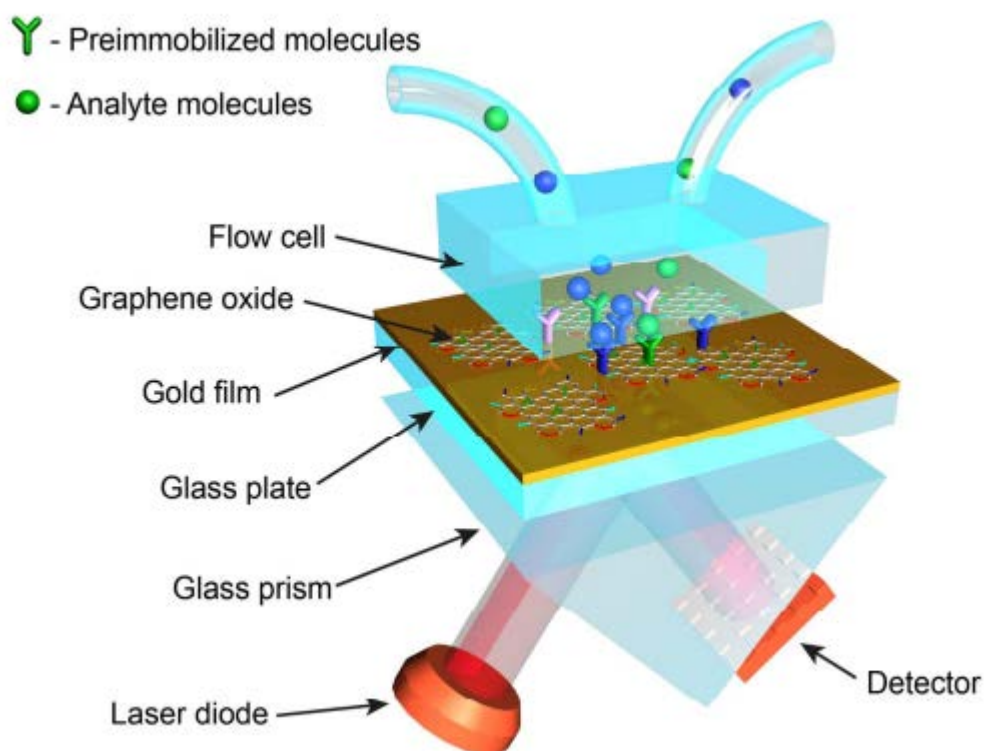


Для тестирования любого лекарства необходимо провести исследование его взаимодействия с живой тканью. Для этих целей весьма хорошо себя показали оптические биосенсоры. Их преимущество состоит в следующем: высокая чувствительность, определение кинетики реакции в режиме реального времени, а также небольшое количество исследуемого материала [1]. Именно такие критерии являются основоопределяющими при клинических исследованиях. В данной работе мы использовали оптические биосенсоры, основанные на традиционном SPR-методе. Чип представляет собой стеклянную пластинку с тонкой пленкой золота, на которую нанесен адсорбирующий слой. Под чипом находится лазер, который возбуждает резонансные колебания поверхностных плазмонов (ПП). Параметры резонанса чувствительны к той среде, которая контактирует с пленкой, и, при изменении ее состава, меняются и параметры.

Рис. 1 Схема ППП



Чувствительность биосенсора к подобным изменениям определяется следующей формулой [1]:

$$S = \frac{\Delta P}{\Delta C} = \frac{\Delta P}{\Delta n} \cdot \frac{\Delta n}{\Delta C} = S_{RI} \cdot E$$

В данной формуле нас интересует величина  $E$  - эффективность заполнения поверхности, которая зависит от типа анализируемых молекул и количества центров связывания. Изменяя эти два фактора могут значительно увеличить чувствительность чипа. Перспективным материалом для биосенсоров считается оксид графена: он обладает большой площадью поверхности, дешев в изготовлении, а также взаимодействует с большим числом биологических молекул. Структурно от графена он отличается наличием  $sp^3$ -гибридизованных атомов углерода на плоской поверхности и функциональных кислородсодержащих групп: эпоксидных, гидроксильных и карбоксильных [2]. Именно они и позволяют производить ковалентную иммобилизацию биологических молекул на чип. Наиболее распространенный тип иммобилизации - через карбоксильные группы, активированные с помощью карбодимидной реакции.

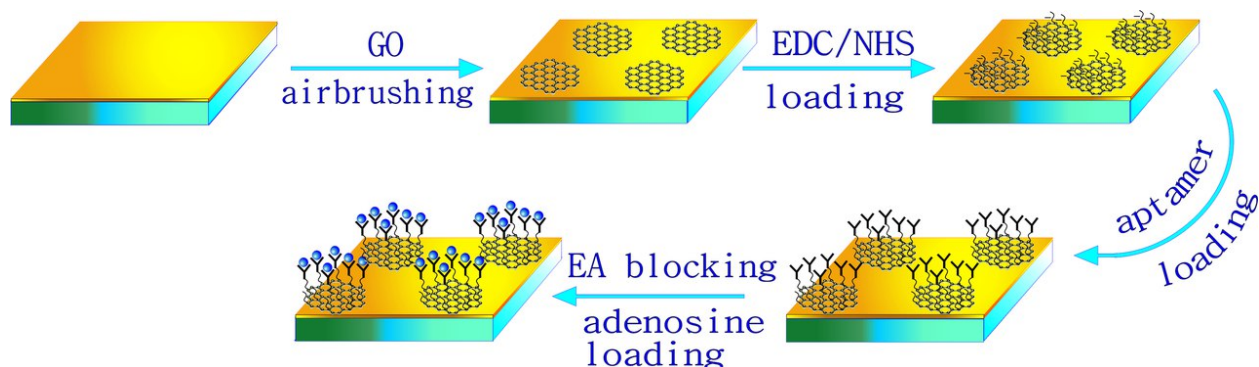
При исследовании биомолекулярных взаимодействий методом спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса одним из ключевых факторов, определяющих эффективность, является размер анализируемых биологических объектов. Детектирование молекул малого размера (до 10 кДа) методом ППР затруднено из-за слабого изменения сигнала детекции. Однако при их адсорбции на поверхность оксида графена становится возможным использование большего количества активированных центров. Тем более, на данный момент к использованию молекул малого размера в качестве лекарственных препаратов выявлен повышенный интерес, ведь с уменьшением размера резко возрастает их способность проникать сквозь клеточные мембраны.

В качестве таких молекул были выбраны аптамеры. Это синтетические одноцепочечные РНК или ДНК длиной 30—100 нуклеотидов (массой около 5-15 кДа), обладающие способностью распознавать и связывать определенные молекулы лиганда с высоким сродством и специфичностью[3]. Аптамеры можно рассматривать, как аналоги антител. При этом они имеют ряд важных преимуществ. Они имеют значительно меньший размер, стабильны при высоких температурах, и технология их производства значительно проще. Кроме того, их концевые участки легко модифицируются необходимыми фрагментами или функциональными группами.

В нашем эксперименте мы используем аптамеры к нуклеозидам (аденозину) и аминокликозидам (тетрациклину). Такой выбор был сделан не случайно: в настоящее время необходим постоянный мониторинг наличия антибиотиков в окружающей среде и продуктах питания. Нуклеозиды же играют важную роль в биохимических процессах: передачи энергии и сигналов. Аденозин нашел свое применение в лечении болезни Паркинсона, тремора и мышечной дистонии – в данных методиках также необходим контроль его количества.

Сам эксперимент состоит в следующем: на чип напыляется оксид графена (100 мкг) методом аэрографии, затем в проточной ячейке спектрометра на основе ППР проводятся активация карбоксильных групп раствором EDC/NHS, и последовательная адсорбция аптамера (8,9 kDa), этаноламина – для блокировки не занятых активных центров - и аденозина. Адсорбция лиганда подтвердила, что в ходе эксперимента аптамеры не потеряли своих конформационных особенностей. Также было проведены предварительные оценки ожидаемого сигнала, исходя из ранее проведенного опыта с белком NA по аналогичной схеме. Согласно соотношению масс аптамера и белка предполагалось уменьшение сигнала в 7 раз. Однако, экспериментальные данные более чем в два раза превзошли теоретические оценки, что еще раз подтверждает эффективность использования оксида графена для исследования низкомолекулярных веществ. Также мы планируем провести аналогичный эксперимент с чипом на основе CMD – одного из наиболее распространённых полимерных покрытий на коммерческих чипах. Данное сравнение позволит подтвердить эффективность сенсоров на основе оксида графена по сравнению с остальными биопокрытиями. Простые оценки количества карбоксильных групп показывают, что при одинаковых толщинах декстрана и оксида графена во втором содержится примерно в 40 раз больше карбоксильных групп. Такие значительные различия в количестве потенциальных центров связывания осаждаемых молекул предполагают пропорциональные изменения в сигнале. Таким образом, подобная методика использования оксида графена в качестве связующего слоя позволит значительно повысить чувствительность существующих биосенсоров и сделает возможными регистрации критически малых количеств исследуемого вещества.

Рис.2 Схема эксперимента



Список литературы:

- 1) *Y.V. Stebunov [et al.]* Highly sensitive and selective sensor chips with graphene-oxide linking layer – ACS Appl. Mater. Interfaces – 2015 - 7 (39) - pp 21727–21734
- 2) *Daniel R. Dreyer [et al.]* The chemistry of graphene oxide – Chem. Soc. Rev. - 2009 – 39 – pp 228-240
- 3) *Nucleic Acid and Peptide Aptamers/ ed. by Günter Mayer* – Springer Protocols: Methods in Molecular Biology- V.535 – New York: Humana Press – 405 p