

РАЗРАБОТКА ВЫСОКОСПЕЦИФИЧНОЙ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ  
НАНОСЕНСОРА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ИОНОВ СВИНЦА  
НА ОСНОВЕ ДНК-АПТАМЕРА

П.Ю. КРУПНЫ, М.Г. ДИВАШУК, Г.И. КАРЛОВ

(Центр молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени КА. Тимирязева)

**Разработана флуорофорная сигнальная система аптамерного наносенсора на ионы свинца. Наибольшую чувствительность показали флуоресцентный краситель FAM и гаситель ВНQ-2. Выявлено некоторое сродство наносенсора к ионам цинка, значительно меньшее, чем к ионам свинца. Данная сигнальная система может быть рекомендована при изготовлении образца наносенсора на ионы свинца.**

*Ключевые слова:* наносенсор, ионы свинца, аптамер, флуорофор.

Разработка наносенсоров, конкурентоспособных в отношении наиболее чувствительных и избирательных аналитических инструментальных анализов, является важной задачей в настоящее время. Это проблема особенно актуальна для обнаружения металлов, потому что многие ионы металлов очень похожи и иногда даже идентичны по заряду, ионному радиусу и другим показателям, что затрудняет их детекцию в ультрамалых концентрациях из-за помех со стороны ионов других металлов. Одним из опасных для здоровья человека металлов является свинец. По степени воздействия на живые организмы свинец отнесен к классу высокоопасных веществ наряду с мышьяком, кадмием, ртутью, селеном, цинком, фтором и бензапиреном [1]. Метод простой быстрой детекции и количественного определения свинца на месте в реальном времени позволит минимизировать воздействие свинца на человека и его здоровье. В связи с этим нами был рассмотрен новый альтернативный метод проектирования высокочувствительного и избирательного наносенсора на ионы свинца на основе ДНК-аптамеров, так как они представляют собой перспективную базу для детекции металлов. ДНК-аптамер представляет собой ДНК-цепочку, обладающую каталитической активностью. Схема наносенсора включает систему узнавания (двойная автоферментная цепочка ДНК) и сигнальную флуоресцентную систему (флуорофор и его гаситель). В присутствии ионов  $Pb^{2+}$  происходит расщепление системы узнавания, в результате чего флуорофор и гаситель пространственно разъединяются и происходит испускание сигнала [3]. Для того чтобы наносенсоры на основе ДНК-аптамеров можно было применять в физиологических процессах или полевых исследованиях, необходимо разработать адаптивные сенсоры, которые сохраняют свои оптимальные функции в широком диапазоне условий окружающей среды. Например, конформация и специфичность аптамеров часто зависят от ионной силы, потому что катионы могут уменьшить силы электростатического поля в остове ДНК. Также для многих аптамерных наносенсоров оптимальными являются только строго определенные ионные среды [4]. Поэтому важно спроектировать сенсоры, которые будут функциональны при желательных условиях, или сенсоры, которые сохраняют свою реакцию и чувствительность при разнообразных условиях. Одним из критических элементов конструкции флуорофорного аптамерного наносенсора является сиг-

нальная система. Источник сигнала — флуорофор — прикрепляется с одной стороны цепочки ДНК, а гаситель — на противоположной стороне той же цепочки, а также на комплементарной цепи со стороны флуорофора. Этим достигается максимальное подавление сигнала флуорофора в отсутствии ионов свинца флуоресцентного бэкграунда («шумов»). При этом используемая сигнальная система не должна давать ложно положительную реакцию на ионы других тяжелых металлов. Создание оптимальной сигнальной системы позволяет обеспечить как увеличение чувствительности наносенсора, так и стабильность его работы. Кроме того, возможно и уменьшение его себестоимости, что в конечном счете может обеспечить его большую доступность для массовых анализов.

Целью наших исследований было разработать оптимальную и высокоспецифичную флуорофорную сигнальную систему аптамерного наносенсора на ионы свинца.

### Материалы и методы

Ферментная (5E) и субстратная (5S) цепочки ДНК с ковалентно присоединенными молекулами флуорофора и гасителя флуоресценции синтезированы в ЗАО «Синтол». В качестве флуорофоров использовали карбоксифлуоресцеин (FAM), тетраметилкарбоксихиоламины (TAMRA) и 6-карбоксихиоламины (ROX); в качестве гасителей флуоресценции — BHQ-1 для флуорофора FAM, BHQ-2 — для флуорофоров TAMRA и ROX. Серия стандартных растворов ионов свинца различной концентрации была получена путём разведения стандартного раствора ионов свинца концентрацией 0,1 мг/см<sup>3</sup> («Эколан»),

В пробирки на 200 мкл вносили 150 µl Tris и 7,5 µl NaCl (0,05 M); затем добавляли 1,5 µl 5S (субстратной цепочки ДНК) и 5E (ферментной цепочки ДНК). Содержимое пробирок перемешивали на микроцентрифуге. Пробирки устанавливали в блок амплификатора «iQ iCycler» («BioRad», США) и осуществляли приготовление наносенсора в следующем режиме: 90°C (2 мин); далее 17 шагов по 1 мин с изменением температуры от 85 до 0,5°C с каждым шагом на 5°C.

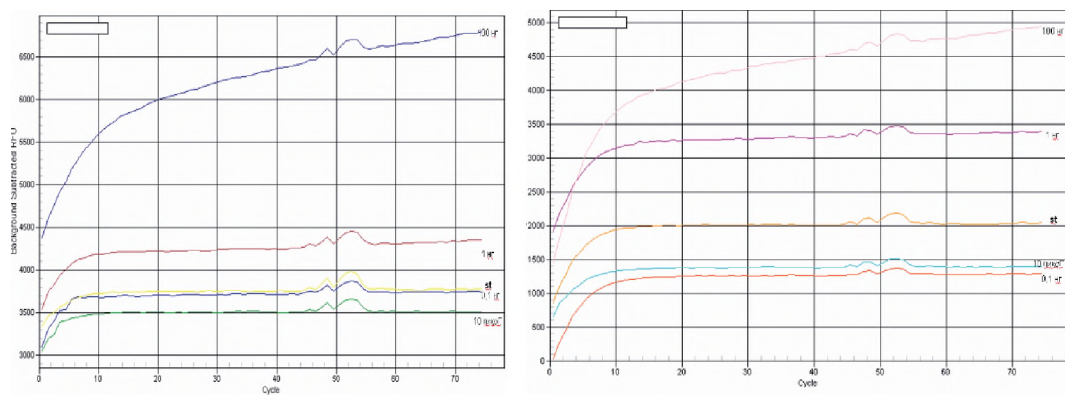
В пробирки вносили соответствующее количество ионов свинца или контрольных образцов других тяжелых металлов, осуществляли реакцию детекции ионов свинца в следующем режиме: 75 циклов по 30 с при 25°C. Уровень флуоресценции детектировали на экране монитора по конечной точке. В качестве отрицательного контроля для каждого флуорофора использовали рабочий раствор с наносенсором без добавления ионов свинца.

Дисперсионный анализ проводили в соответствии с методикой Б.А. Доспехова [2].

### Результаты и их обсуждение

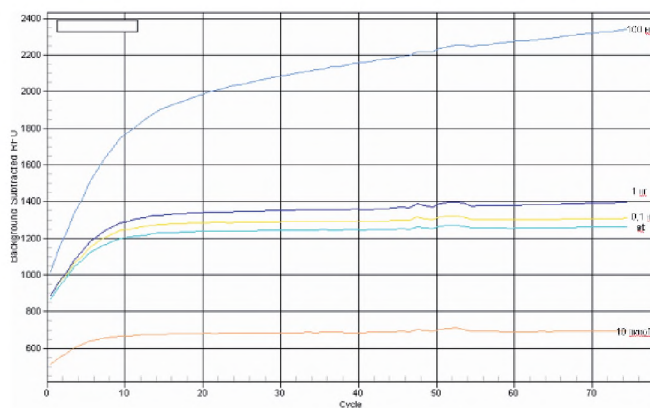
К используемой в экспериментах цепочке ДНК-аптамера на одном конце была ковалентно присоединена молекула флуорофора (FAM, TAMRA и ROX), на другом — гаситель флуоресценции (BHQ-1 для FAM, BHQ-2 для TAMRA и ROX). Детекцию уровня флуоресценции проводили как в режиме реального времени (рис. 1 а-в), так и по конечной точке (табл. 1).

Абсолютный прирост флуоресценции определяли как разницу между начальной точкой флуоресценции (после приготовления наносенсора) и конечной точкой флуоресценции (после 75 циклов реакции). Относительный прирост флуоресценции определяли как отношение абсолютного прироста к начальной точке флуоресценции.



а

б



в

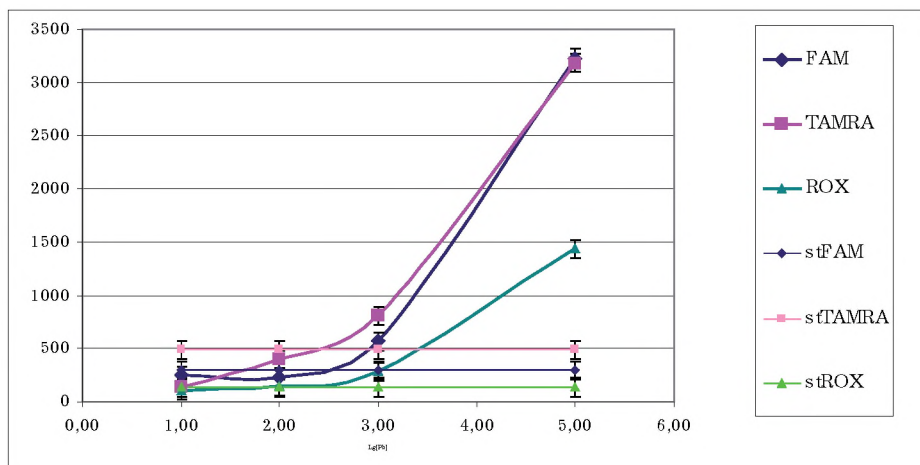
**Рис. 1.** Детекция ионов свинца в реальном времени при использовании флуоресцентного красителя FAM (а), TAMRA(б), ROX (в) при различных концентрациях ионов свинца в рабочем растворе (100 нг; 1 нг; 0,1 нг; отрицательный контроль)

Таблица 1

**Уровни флуоресценции, измеренные по конечной точке на различных флуорофорах**

Количество ионов свинца добавленного в образец	Абсолютный прирост флуоресценции	Относительный прирост флуоресценции	Абсолютный прирост флуоресценции	Относительный прирост флуоресценции	Абсолютный прирост флуоресценции	Относительный прирост флуоресценции
	FAM		TAMRA		ROX	
10 нг	176,67	0,06	167,00	0,13	146,67	0,14
0,1 нг	310,67	0,09	488,00	0,22	153,00	0,13
1 нг	712,67	0,21	728,00	0,27	273,67	0,24
100 нг	3239,00	0,87	2895,00	1,31	1539,67	1,33
St	286,00	0,08	503,67	0,16	168,67	0,15

Для статистической обработки применяли дисперсионный анализ двухфакторного опыта (первый фактор — флуорофор, второй фактор — количество свинца). В качестве данных использовали абсолютный прирост флуоресценции. Для удобства восприятия данные отображены в виде графика на рисунке 2.



**Рис. 2.** Сравнительная характеристика чувствительности наносенсоров с различными типами флуорофоров. Кривые показывают зависимость степени свечения от концентрации ионов свинца. Прямые с индексом st — отрицательный контроль. По оси абсцисс отложен десятичный логарифм количества ионов свинца в растворе (нг).  $HCP_{05} = 175$

На основании проведенных нами испытаний наиболее оптимальным нам представляется использование флуоресцентного красителя FAM и гасителя ВНQ-2. Их чувствительность находится на уровне с флуорофором TAMRA и превышает флуорофор ROX, что позволяет выявить присутствие 1 нг ионов свинца, в то время как ROX не показывает существенных отличий от отрицательного стандарта на данном уровне. Кроме того, в ходе экспериментов было отмечено преимущество флуорофора FAM перед флуорофором TAMRA ввиду его большей стабильности, что проявлялось в большей сходимости полученных результатов.

В результате выполненных работ была подобрана оптимальная сигнальная система, которая включает в себя флуорофор FAM и гаситель флуоресценции ВНQ-2. Данная сигнальная система может быть рекомендована при изготовлении образца наносенсора на ионы свинца.

Для испытания селективности сенсора на ионы свинца при наличии ионов других металлов была протестирована ответная реакция сенсора на соли 12 конкурирующих металлов при их содержании 1 мкг в рабочем растворе. Для контроля использовали раствор с добавлением ионов свинца в количестве 100 нг, т.е. на один порядок меньше, чем тестируемый ион-конкурент.

В качестве обобщенного показателя для оценки различия чувствительности наносенсора к ионам свинца и ионам-конкурентам нами был предложен следующий коэффициент:  $K_c = (a - b)/c$ , где  $a$  — прирост флуоресценции при добавлении ионов свинца,  $b$  — прирост флуоресценции при добавлении ионов конкурирующего металла,  $c$  — среднее значение флуоресценции в образцах до добавления ионов металлов (начальный уровень флуоресценции).

При значении  $K_c < 0,5$  требовались дополнительные исследования. Результаты детекции в реальном времени приведены и в таблице 2.

Таблица 2

**Избирательность детекции наносенсора к ионам свинца и конкурирующим металлам**

Начальный уровень флуоресценции	Добавленные ионы металлов	Уровень флуоресценции после детекции	Абсолютный прирост флуоресценции	Разница прироста флуоресценции на образцах с добавлением свинца и конкурирующего металла	В среднем к начальному уровню флуоресценции	$K_c$
3167,67	Ni	1167,33	-2000,33			
3554,33	Pb	5820,00	2265,67	4266,00	3361,00	1,27
3584,33	Mg	3563,33	-21,00			
3790,33	Pb	6569,33	2779,00	2800,00	3687,33	0,76
3847,67	Zn	4918,67	1071,00			
4014,33	Pb	6579,67	2565,33	1494,33	3931,00	0,38
3170,33	Be	6502,67	3332,33			
3218,00	Pb	15154,67	11936,67	8604,33	3194,17	2,69
3518,67	Ca	6278,00	2759,33			
3900,67	Pb	17082,33	13181,67	10422,33	3709,67	2,81
3537,33	Hg	4968,33	1431,00			
3106,33	Pb	15641,67	12535,33	11104,33	3321,83	3,34
1425,33	Sr	2362,33	937,00			
1198,00	Pb	3707,00	2509,00	1572,00	1311,67	1,20
1314,00	Ba	1427,33	113,33			
2664,00	Pb	5738,67	3074,67	2961,33	1989,00	1,49
3638,33	Cd	-1576,00	-5214,33			
2088,00	Pb	4723,00	2635,00	9937,33	2863,17	3,47
700,33	Co	718,00	17,67			
1226,33	Pb	2353,67	1127,33	1109,67	963,33	1,15
1135,67	Mn	1399,67	264,00			
1318,00	Pb	2583,00	1265,00	1001,00	1226,83	0,82
1269,00	Cu	1405,67	136,67			
989,33	Pb	1816,33	827,00	690,33	1129,17	0,61

Большинство металлов вызвало лишь слабое изменение флуоресценции. Коэффициент специфичности у всех металлов кроме Zn превышал 0,5, при этом концентрация иона конкурента при анализе в 10 раз превышала концентрацию ионов свинца в контрольном опыте.

В случае Zn наблюдалась некоторая Zn-зависимая флуоресценция. В связи с этим нами были поставлены дополнительные эксперименты (табл. 3).

Таким образом, несмотря на то что наблюдается некоторое сродство наносенсора к ионам цинка, оно существенно меньше, нежели его сродство к ионам свинца. Так, прибавка флуоресценции от присутствия в рабочем растворе 100 нг ионов цинка находится на уровне прибавки от флуоресценции 1 нг ионов свинца, и таким образом

**Избирательность детекция наносенсора к ионам свинца  
и ионам цинка при их различной концентрации**

Начальный уровень флуоресценции	Количество добавленных ионов свинца и цинка	Уровень флуоресценции после добавления ионов свинца и цинка	Абсолютный прирост флуоресценции	Относительный прирост флуоресценции
3097,33	Zn 1 нг	2938,33	-159,00	-0,05
3350,33	Zn 10 нг	3402,33	52,00	0,02
3156,67	Zn 100 нг	3655,67	499,00	0,15
3668,00	Pb 1 нг	4118,33	450,33	0,12
3515,00	Pb 10 нг	4999,00	1484,00	0,42
3257,00	Pb 100 нг	5837,33	2580,33	0,79

чувствительность наносенсора к ионам свинца превышает таковую к ионам цинка примерно в 100 раз.

### Заключение

В результате выполненных работ была подобрана высокоспецифичная сигнальная система для наносенсора на основе ДНК-аптамера, которая включает в себя флуорофор FAM и гаситель флуоресценции BHQ-2. Данная сигнальная система может быть рекомендована при изготовлении образца наносенсора на ионы свинца.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках выполнения ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы» ГК № 16.552.11.7032 от 29 апреля 2011 г. на оборудовании ЦКП «ВНИИСБ».

### Библиографический список

- ГОСТ 17.4.1.02-83. Охрана природы. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения.
- Доспехов Б.А.* Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 5-е изд., доп. и перераб. М.: Агропромиздат, 1985. 351 с.
- Jing Li, Yi Lu.* A Highly Sensitive and Selective Catalytic DNA Biosensor for Lead Ions. *J. Am. Chem. Soc.*, 2000. 122. 10466-10467.
- Li Y, Lu Y.* (eds.). *Functional Nucleic Acids for Analytical Applications*, Springer Science + Business Media, LLC, 2009. 395 p.

*Рецензент* — д. б. н. Л.И. Хрусталева

### SUMMARY

The signal fluorophore system for aptamer nanosensor to detect lead ions has been developed. Fluorophore FAM and quencher BHQ-2 have shown the highest sensitivity. Certain affinity of the nanosensor to zinc ions is much smaller than to lead ions. The developed signal system can be recommended for manufacturing nanosensor for lead ions.

*Key words:* nanosensor, lead ions, aptamers, fluorophore.

**Крупин Павел Юрьевич** — к. б. н., мл. научн. сотр. центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (тел. (499) 977-72-01).

**Дивашук Михаил Георгиевич** — к. б. н., ст. научн. сотр. центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (e-mail: divashuk@gmail.com).

**Карлов Геннадий Ильич** — д. б. н., руководитель центра молекулярной биотехнологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева (127550, г. Москва, ул. Тимирязевская, 49; тел. (499) 977-72-01; e-mail: karlovg@gmail.ru; karlov@timacad.ru).