

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

*На правах рукопису*

**Мацішин Микола Йосипович**

УДК 575.224.22

**РОЗРОБКА АФІННИХ БІОСЕНСОРНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ДЕТЕКТУВАННЯ  
МУТАЦІЙ, ПОВ'ЯЗАНИХ З Rh'-ПОЗИТИВНОЮ ЛЕЙКЕМІЄЮ ТА  
РЕЗИСТЕНТНИМИ ФОРМАМИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ**

03.00.20 – біотехнологія

**Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук**

Науковий керівник:

**Солдаткін Олексій Петрович**

д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України

**КИЇВ – 2016**

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	5
1. РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	12
1.1. Діагностування захворювань на генному рівні .....	12
1.2. Діагностика хронічної мієлоїдної лейкемії на генному рівні .....	15
1.3. Діагностування стійких до антибіотиків форм туберкульозу на генному рівні .....	18
1.4. Гібридизаційні ДНК біосенсиори.....	20
1.5. Принцип роботи біосенсора на базі ППР.....	22
1.6. Принцип роботи біосенсора на базі електрохімічної імпедансної спектроскопії.....	29
1.7. Висновки.....	37
2. РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ .....	38
2.1. Реактиви.....	38
2.2. Використані в роботі типи перетворювачів.....	40
2.3. Метод імпеданс-спектроскопічного дослідження для аналізу роботи ДНК-біосенсора .....	40
2.4. Створення біоселективного шару геносенсора .....	42
2.5. Синтез наночастинок золота.....	42
2.6. Метод контролю поверхневої густини ДНК-мішеней на поверхні наночастинок золота та приготування розчинів модифікованих НЧЗ.....	43
2.7. Використання методу поверхневого плазмонного резонансу .....	45
2.8. Розробка і використання програм для оптимізації процесу вимірювань.....	46
3. РОЗДІЛ 3. РОЗРОБКА ІМПЕДИОМЕТРИЧНОГО ГЕНОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МУТАЦІЙ В ГЕНІ <i>rhoB M. TUBERCULOSIS</i> .....	51
3.1. Вибір нуклеотидної послідовності та довжини фрагмента гена <i>rhoB M. tuberculosis</i> для використання як проби при іммобілізації на сенсорній поверхні ..	51
3.2. Розробка імпедіометричного ДНК біосенсора для виявлення мутацій в гені <i>rhoB M. tuberculosis</i> .....	56
3.3. Висновки.....	64
4. РОЗДІЛ 4. РОЗРОБКА ГЕНОСЕНСОРА ППР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПОСЛІДОВНОСТІ ГІБРИДНОГО ГЕНА BCR-AVL.....	66

4.1. Вибір оптимальної послідовності ДНК-проби для розпізнавання фрагменту гену <i>bcr-abl</i> .....	66
4.2. Дослідження процесу гібридизації ДНК за допомогою спектроскопії ППР	69
4.3. Розпізнавання комплементарних олігонуклеотидів за допомогою контрольованої зміни температури на базі спектрометра ППР .....	78
4.4. Підсилення сигналу ППР за допомогою наночастинок золота .....	83
4.5. Висновки.....	98
5. РОЗДІЛ 5. АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	100
ВИСНОВКИ .....	110
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ .....	112

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

A – аденін;

C – цитозин;

G – гуанін;

Mili-Q – стандарт чистоти води, розроблений Millipore Corporation;

T – тимін;

AЧХ – амплітудно-частотна характеристика;

ВПГ – внутрішня площина Гельмгольца;

ГМЛ – гостра мієлоїдна лейкемія;

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота;

ЕІС – електрохімічна імпедансна спектроскопія;

ЗПГ – зовнішня площина Гельмгольца;

МКГ – 6-меркапто-1-гексанол;

МРТБ – мультирезистентний туберкульоз;

НЧЗ – наночастинки золота;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

ППР – поверхневий плазмонний резонанс;

ПХП – поверхнева хвиля в плазмі;

ХМЛ – хронічна мієлоїдна лейкемія.

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Повнорозмірне секвенування геномів великої кількості різноманітних видів живих організмів та прогрес в дослідженнях на молекулярно-генетичному рівні причин виникнення захворювань дали можливість їх діагностування на ранніх стадіях за допомогою методів молекулярної біотехнології. Тому детектування наявності тих чи інших специфічних мутацій послідовностей нуклеїнових кислот, яке можна було б здійснити за допомогою ДНК-біосенсорів (геносенсорів), базуючись на вивченні широкого масиву даних про молекулярні механізми патогенезу, набуває важливого діагностичного значення. В поточному десятилітті спостерігається значне зростання інтересу до ДНК-сенсорів, які з часом можуть стати одним із базових рутинних методів молекулярної діагностики. Головні їх переваги полягають в поєднанні простоти використання, експресності, надійності та відносно низької ціни.

Гібридизаційні геносенсори базуються на розпізнаванні комплементарних послідовностей ДНК-мішеней досліджуваного зразка в разі їх гібридизації з одноланцюговими олігонуклеотидами-пробами, попередньо іммобілізованими на сенсорній поверхні. По справжньому ефективні гібридизаційні геносенсори повинні бути в змозі розрізнити такі послідовності ДНК, які відрізняються заміною всього одного або кількох нуклеотидів. Дискримінація повністю та частково комплементарних послідовностей ДНК на сенсорній поверхні може бути досягнута за рахунок використання різних факторів, що впливають на ефективність гібридизації, в тому числі вдалого вибору довжини послідовності-мішені, температури, концентрації та складу буферного розчину для гібридизації, умов після гібридизаційної обробки, та інших факторів.

В даній роботі розроблено підходи до створення оптичного біосенсора для детектування мутацій послідовностей ДНК, пов'язаних з Rh'-позитивною лейкемією, та імпедіметричного біосенсора для детектування мутацій послідовностей ДНК, пов'язаних з резистентними формами туберкульозу. Кожна з цих задач має свою окрему діагностичну цінність і, незважаючи на вагому різницю в принципах

формування біосенсорного сигналу, ці гібридизаційні ДНК-сенсори мають багато спільних особливостей і переваг, в тому числі можливість детектування мутацій послідовностей ДНК без застосування молекулярних міток.

Один з об'єктів дослідження – пов'язаний з хронічною мієлоїдною лейкемією (ХМЛ). Вважають, що всі лейкемічні клітини є нащадками однієї плюрипотентної стовбурової клітини, яка була злоякісно трансформована і передала ці властивості далі, після чого популяція клітин із порушеннями диференціювання прогресує і поступово замінює нормальні гемопоетичні клітини. Причиною таких змін прийнято вважати хромосомні аберації – транслокації, інверсії, делеції тощо. Філадельфійська (Ph<sup>'</sup>) хромосома – перший описаний цитогенетичний маркер ХМЛ, що є результатом реципрокної транслокації між 22-ю і 9-ю хромосомами, вона по суті є укороченою 22-ю хромосомою. Внаслідок цього утворюється гібридний ген *bcr-abl*, білковий продукт якого, як вважають, спричиняє розвиток хвороби. Розпізнавання саме цього гена дозволить забезпечити діагностування захворювання на ранніх стадіях і правильно вибрати відповідні ліки для супресії активності патогенного протеїна Bcr-Abl.

Інша частина дослідження була пов'язана з розробкою підходів біосенсорного діагностування резистентної до антибіотиків форми туберкульозу. Згідно з даними Всесвітньої організації охорони здоров'я в 2014 у світі приблизно 9,6 мільйонів людей захворіли на туберкульоз, а 1,2 мільйони людей померли від цього захворювання. Попри зниження рівня смертності кількість хворих, які померли від туберкульозу, залишається неприпустимо великою, враховуючи той факт, що більшості цих смертей можна було б запобігти. Однією з головних проблем сьогодні є розповсюдження форм мультирезистентного туберкульозу (МРТБ), тобто форм стійких до двох або навіть декількох протитуберкульозних препаратів, наприклад до рифампіцину і ізоніазиду. В 2014 у світі було діагностовано приблизно 480 тисяч випадків МРТБ. Можливості лікування МРТБ часто обмежуються малодоступністю і складністю його діагностики. Наприклад, типовий тест резистентності культури *M. tuberculosis* на твердому середовищі займає від 4 до 6 тижнів. Тому, розробка

надійних, простих і швидких методів діагностики резистентних форм туберкульозу набуває особливої актуальності.

Саме біосенсорні методи на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) та електричної імпеданс спектроскопії (ЕІС) здатні забезпечити з необхідною чутливістю та селективністю розпізнавання мутацій в послідовностях генів без використання молекулярних міток, тому вони стали об'єктом даного дослідження.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертація відповідає основному плану робіт кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках бюджетної теми № 11БФ07-03 «Фізико-хімічні механізми функціонування живого на різних рівнях організації» (№ держ. реєстрації 0111U007663, 2011-2015 рр.), бюджетної теми лабораторії біомолекулярної електроніки Інституту молекулярної біології та генетики НАН України № 2.2.4.22 «Розробка наукових засад створення афінних біосенсорів на основі біологічних молекул та біоміметиків» за 2013-2017рр., теми № 99-Н «Дослідження взаємодії нуклеїнових кислот з нанокристалічними напівпровідниками для створення нових біонаноструктурованих матеріалів, здатних розпізнавати біологічно важливі маркери спадкових захворювань», що виконувалась в рамках проекту цільової комплексної програми фундаментальних досліджень НАН України «Фундаментальні проблеми наноструктурних систем, наноматеріалів, нанотехнологій» на 2010-2014 рр.

Результати роботи були використані для реалізації проекту № 20/2 «Розробка, експериментальна апробація та метрологічна атестація приладу-сенсора на основі ефекту локалізованого поверхневого плазмонного резонансу у масивах наноструктур золота та срібла. Дослідна експлуатація та метрологічне забезпечення комплексної науково-технічної програми НАН України «Сенсорні прилади для медико-екологічних та промислово-технологічних потреб: метрологічне забезпечення та дослідна експлуатація» (№ держ. реєстрації 0113U002508, 2013-2017 рр.). Частина роботи була також виконана в рамках міжнародного проекту «Integrated nanodevices» 7-ї рамкової програми ЄС (2013-2015 рр., номер PIRSES-

GA-2012-318524). Крім того, частину роботи було виконано в рамках проекту НТЦУ (№6044, 2015-2017рр.) «Розробка «розумних наноносіїв» на ефекті фототеплового плазмонного підсилення для цільової доставки ліків в організмі людини».

**Мета і задачі дослідження.** Метою роботи було розробити наукові і технологічні підходи до створення ДНК-сенсорів для детектування мутацій, пов'язаних з Ph<sup>+</sup>-позитивною лейкемією та резистентними формами туберкульозу.

Для виконання даної мети були сформульовані наступні завдання:

1. Здійснити вибір оптимальної довжини олігонуклеотидів-проб та їх послідовностей для визначення мутацій в гібридному гені *bcr-abl* та гені *rhoB M. tuberculosis*.
2. Розробити комп'ютерні програми для аналізу рівноважних констант гібридизації послідовностей ДНК в гетерогенних умовах на основі даних спектроскопії поверхневого плазмонного резонансу, а також для швидкої та зручної обробки первинних даних, отриманих при використанні таких приладів, як «Nanodrop 2000», «Плазмон-6», «Votalab», «Unico».
3. Визначити оптимальні параметри для роботи як імпедіометричного біосенсора, так і сенсора на основі явища поверхневого плазмонного резонансу (діапазон робочих частот, величина змінної напруги, концентрація електрохімічних маркерів, величина поверхневої густини олігонуклеотидів-проб, іонна сила буферного розчину тощо).
4. Розробити імпедіометричний біосенсор для детектування мутацій в гені *rhoB M. tuberculosis*.
5. Розробити геносенсор на основі спектроскопії поверхневого плазмонного резонансу для селективного розпізнавання фрагментів гібридного гена *bcr-abl*.
6. Дослідити можливість покращення селективності ДНК-сенсора через зміну рівня жорсткості умов гібридизації.
7. Розробити методику кількісної оцінки рівня іммобілізації олігонуклеотидів на поверхні наночастинок золота для їх подальшого використання для підсилення біосенсорного сигналу.



**Об'єкт дослідження:** фрагменти гена *rpoB M. tuberculosis* (немутовані та з мутацією в одній основі), послідовності гібридного гена *bcr-abl* (гібридні, вихідні).

**Предмет дослідження:** розробка біосенсорів для високоселективного розпізнавання і визначення ДНК-мішеней на прикладі гена *rpoB M. tuberculosis* та гена, що кодує протеїн Bcr-Abl.

**Методи дослідження:** поверхневий плазмонний резонанс (ППР), електрохімічна імпедансна спектроскопія (ЕІС), кондуктометрія, флуоресцентна і електронна адсорбційна спектроскопія, методи статистичної обробки даних. Для обробки і систематизації експериментальних даних було написано ряд програм для аналізу кривих ППР, визначення рівноважних констант, аналізу спектрів ЕІС та визначення концентрацій наночастинок за спектрами екстинкції.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше створено імпедіометричний біосенсор для селективного детектування точкової мутації в кодоні 531 гена *rpoB M. tuberculosis*, що пов'язана зі стійкістю бактерії до рифампіцину.

За допомогою розробленого нами біосенсора ППР та спеціально написаної комп'ютерної програми розраховано рівноважні константи взаємодії олігонуклеотидів-проб та фрагментів гена *rpoB M. tuberculosis*, як для послідовностей нормального гена, так і для тих, що містять мутацію в одній основі. Оцінено енергії взаємодії проби з цими послідовностями. Аналогічна робота була проведена для фрагменту послідовності гібридного гена *bcr-abl* та олігонуклеотидів, що відповідають нормальним генам *bcr* та *abl*.

Вперше розроблено метод кількісної оцінки рівня іммобілізації олігонуклеотидів, модифікованих флуорофором Су3, на поверхні наночастинок золота (Патент України на корисну модель № 93555).

Вперше було досягнуто селективного розпізнавання повністю та частково комплементарних олігонуклеотидів за допомогою контрольованої зміни температури на базі спектрометра ППР з системою термостабілізації, контролю та регулювання температури.

Запропоновано підходи, написано комп'ютерні програми для оптимізації вимірювального процесу з використанням розроблених біосенсорів, отримано кількісні та якісні границі детектування послідовностей ДНК, пов'язаних з Ph'-позитивною лейкемією, та резистентною до рифампіцину формою туберкульозу, показано можливість підсилення біосенсорного сигналу ППР, а, відповідно, і чутливості біосенсора, за допомогою наночастинок золота (НЧЗ).

**Практичне значення одержаних результатів.** Створено лабораторний прототип імпедіометричного біосенсора, який може бути основою комерційного біосенсора для високоселективного розпізнавання послідовностей ДНК. За допомогою методу ППР було визначено рівноважні константи взаємодії послідовностей ДНК в гетерогенних умовах (на сенсорній поверхні). У співпраці зі співробітниками Інституту фізики напівпровідників НАН України ім. В.Є. Лашкарьова було створено і випробувано ППР спектрометр з системою термостабілізації, контролю та регулювання температури для селективного розпізнавання повністю та частково комплементарних олігонуклеотидів.

**Особистий внесок здобувача.** У процесі виконання дисертаційної роботи автором спільно з керівником поставлено мету роботи та сформульовано наукові завдання, самостійно проаналізовано наукову літературу за темою даного дисертаційного дослідження. Разом з керівником складено план роботи та підібрані методи для виконання поставлених завдань. Здобувачем особисто розроблено лабораторний прототип імпедіометричного сенсора для високоселективного розпізнавання ДНК послідовностей. Обговорення та аналіз результатів дослідження проведено з науковим керівником д.б.н., проф., чл.-кор. НАН України О.П. Солдаткіним. Значна частина досліджень виконана у тісній співпраці з к.б.н., с.н.с. О.Е. Рачковим та д.б.н., проф. С.В. Дзядевичем.

Деякі фрагменти роботи були виконані в співавторстві з: к.б.н., с.н.с. В.М. Пешковою, к.т.н., п.н.с. В.Г. Мельником, Л.М. Семеничевою, к. ф.-м. н., н.с. А.В. Мамикіним, к. ф.-м. н., с.н.с. О.Л. Куклюю, к.б.н., н.с. О.Я. Саяпіною, к.ф.-м.н., с.н.с. В.І. Чегелем, к.ф.-м.н., с.н.с. І.О. Янчуком, к.б.н., с.н.с. О.О. Солдаткіним, к. ф.-м. н.,

н.с А.М. Лопатинським, к.ф.-м.н., с.н.с. М.Ю. Лосицьким, А.А. Галушкіною, О.Є. Дудченком, проф. А. Валкаріусом, проф. Н. Жаффрезік, проф. А. Еррашидом.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень були представлені на: 5-ій Міжнародній науково-технічній конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, Україна, 2012); International research and practice conference: «Nanotechnology and nanomaterials» (Буковель, Україна, 2013); Міжнародній науковій конференції «Шевченківська весна» (Київ, Україна, 2013); E-MRS Fall Meeting (Варшава, Польща, 2013); XI Українському біохімічному конгресі (Київ, Україна, 2014); International research and practice conference: «Nanotechnology and nanomaterials» (Львів, Україна, 2015); 7-ій Міжнародній науково-технічній конференції «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології» (Одеса, Україна, 2016).

**Публікації.** Матеріали дисертації опубліковано у 7 наукових статтях у фахових виданнях та тезах 7 доповідей на наукових конференціях, захищено 1-м патентом України, подано дві патентні заявки.

**Структура та обсяг дисертаційної роботи.** Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів, двох розділів основної частини, аналізу і узагальнення результатів досліджень, а також висновків та списку використаних джерел, який охоплює 118 найменувань. Роботу викладено на 125-х сторінках машинописного тексту. Фактичний матеріал дисертації подано у вигляді 43-х рисунків та 5-ти таблиць.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. Діагностування захворювань на генному рівні

З того часу, як Уотсон і Крік в 1953 відкрили структуру дволанцюгової ДНК, розпізнавання і секвенування цих молекул опинилось в сфері інтересів багатьох дослідників. Швидкий розвиток молекулярної генетики та її методів привели до накопичення величезних об'ємів даних про нуклеїнові кислоти, що характеризують той чи інший живий організм. На даний момент (травень 2016, база NCBI) секвеновано понад 2427 геномів еукаріот, 49126 прокариот, 4905 вірусів і з кожним місяцем ці цифри ростуть. Розростання баз даних, їх узагальнення і систематизація дозволили діагностування ряду хвороб на генному рівні [1]. Діагностика на генному рівні є потужною технологією, яка чудово поєднується з сучасними методами мініатюризації біосенсорів, не вимагає відчутних затрат часу на аналіз, не потребує значної кількості генетичного матеріалу, забезпечує можливість недорогого та надійного діагностування.

Генетичні аналізи мають численні застосування в біотехнології, сільському господарстві та землеробстві, при пошуку патогенів в продуктах харчування [2–4] та клінічній діагностиці [5–7]. На даний момент біля 400 захворювань діагностуються шляхом аналізу послідовностей ДНК [8] і кількість захворювань, що може бути діагностовано таким чином, зростає кожного року. Потужність цього підходу лише збільшується через неперервне розширення баз даних і пошук діагностичних генних маркерів. В організмі людини близько 25 тисяч активних генів, зміну структури яких можна пов'язати з виникненням захворювань. Величезна кількість потенційних розробок забезпечує тривалий ріст інтересу до діагностування захворювань на генному рівні і цей тренд дуже далекий до вичерпання.

Діагностування ряду генетичних захворювань за допомогою біосенсора дозволить на ранніх стадіях визначити хворобу і зробити кроки задля запобігання формуванню патогенних протеїнів. При цьому досягається можливість точно встановити структуру патогенного протеїну, що особливо цінно в випадку можливості

формування декількох різних протеїнів, які не однаково взаємодіють з інгібіторами, що використовуються в терапії.

Крім того, можна забезпечити визначення штаму бактерій методами молекулярної генетики, що широко використовується в молекулярно-епідеміологічних дослідженнях для встановлення виду збудника захворювання та епідеміологічного зв'язку між випадками цього захворювання. Цей метод дозволяє відслідкувати походження епідемії, її перебіг, встановити зміни, яких зазнає її збудник. Дає можливість визначити взаємозалежність між стійкістю збудника до протибактеріального препарату і структурою його генів. Таким чином, виникає можливість полегшити лікування резистентних форм захворювань завдяки вчасному їх діагностуванню. Враховуючи, що кожен рік інфекційні захворювання викликають понад десять мільйонів смертей (в 2014 14.7 мільйонів смертей за даними ВОЗ) актуальність цих досліджень не спадає.

На даний момент розробляється нове покоління біосенсорних систем, які повинні поєднати в собі всі необхідні діагностичні інструменти, що здатні забезпечити клінічне діагностування захворювання для правильного і швидкого лікування. Складна біохімічна природа, низька кількість послідовностей ДНК-мішеней в клінічних зразках, змушує використовувати ряд біохімічних та молекулярно-біологічних методів для виділення і ампліфікації ДНК. Серед них полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) використовується найбільш широко. Вона поєднує в собі селективність та можливість багатократної ампліфікації послідовностей ДНК-мішеней. Після стадії ампліфікації необхідно мати механізм розпізнавання послідовності ДНК, що власне, забезпечить діагностику захворювання. Одним із найбільш вдалих інструментів для реалізації цього завдання є біосенсори. Вони поєднують в собі біоселективний елемент (сполуки біологічного або синтетичного походження), перетворювач або детектор, здатний зафіксувати відгук в вигляді зручного для обробки сигналу, та систему обробки сигналу, яка призначена перетворити сигнал в інформацію корисну для користувача.

Розробка ДНК-біосенсорів нова і швидко прогресуюча сфера. Підтвердженням цього є зростання кількості публікацій, пов'язаних з ДНК-сенсорами на приблизно в 20 разів між 1990-м та 2010-м роками (рис.1.1) [9]. Подальший розвиток біосенсорів супроводжується оптимізацією їх робочих характеристик та розширенням області використання [10].

Існує ряд успішних розробок геносенсорів [11–13]. Деякі з них реалізовані як одна зручна система для ампліфікації і розпізнавання ДНК-мішеней. Інші містять класичну техніку виділення і ампліфікації ДНК, поєднану з новітніми стратегіями розпізнавання. По-справжньому ефективні ДНК біосенсори повинні забезпечувати швидке, надійне, недороге розпізнавання ДНК-мішені, тому що розроблювані біосенсори так чи інакше конкуруватимуть з традиційними методами діагностування.

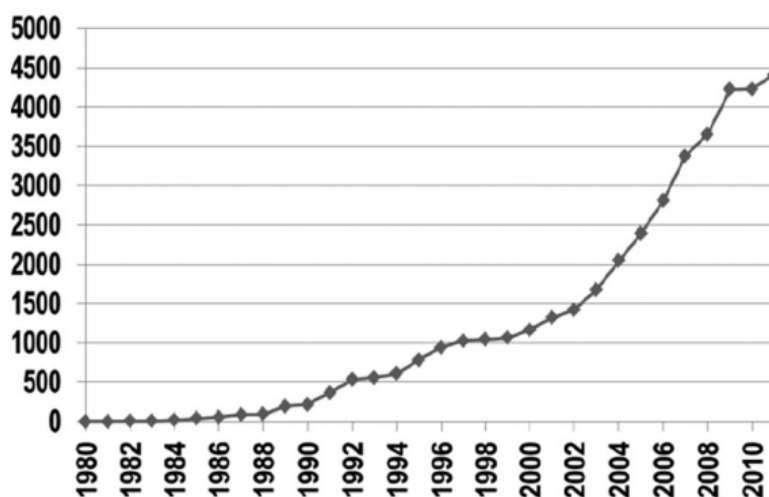


Рис. 1.1. Кількість публікацій пов'язаних з розробкою ДНК біосенсорів

В даній роботі буде зроблена спроба за допомогою розробки ДНК-біосенсорів наблизитись до вирішення таких двох діагностичних задач: визначення хронічної мієлоїдної лейкемії та визначення резистентності до антибіотиків *M. tuberculosis*. В обох випадках традиційні методи діагностики мають суттєві недоліки. Різні види Ph'-позитивних лейкемій виникають внаслідок формування різних форм гібридного гену *bcr-abl*, що супроводжується виникненням різних патогенних протеїнів. Тому точне діагностування типу Ph'-позитивної лейкемії дозволить ефективно використати правильний інгібітор тирозинкінази BCR-ABL, яка відповідає за онкогенну трансформацію клітини. В випадку визначення резистентності штаму бактерії, типовий тест культури *M. tuberculosis* на твердому середовищі займає від 2 до 9 тижнів, зважаючи на це відчутне скорочення часу діагностики набуває особливої актуальності.

## 1.2. Діагностика хронічної мієлоїдної лейкемії на генному рівні

Ph'-позитивні лейкемії – група лейкемій, що характеризуються наявністю філадельфійської (Ph') хромосоми, яка була виявлена вперше у хворих на хронічну мієлоїдну лейкемію (ХМЛ) в 1960 році [14]. Ph'-хромосома була першим охарактеризованим цитогенетичним маркером захворювання, вивчення якого дозволило більш чітко показати патогенез хвороби. Механізм виникнення Ph'-хромосоми був невідомий до 1973 року, в якому було виявлено, що вона є результатом реципрокної транслокації між 9 та 22 хромосомами  $t(9;22)(q34;q11)$  [15]. Першим із виявлених партнерів транслокації був онкоген *abl*, який в нормі знаходиться на 9 хромосомі [16]. З часом на 22 хромосомі було картовано ген *bcr*, його функції до 1984 року залишалися невідомими, тому цей ген отримав назву пов'язану з його схильністю до утворення численних розривів (breakpoint cluster region) [17]. В 1990 році було показано, що можливість появи гібридного протеїна Bcr-Abl пов'язана з порушеннями регуляції тирозин-кінази Abl [18]. В тому ж році вдалось отримати перші тваринні моделі: Bcr-Abl-позитивні гемопоетичні клітини вводили мишам, що викликало мієлопроліферативне захворювання, схоже за симптомами з ХМЛ людини [19]. Ці кроки по вивченні механізмів лейкозогенезу створили підґрунтя для синтезу специфічного інгібітору тирозин-кінази та впровадити його в клінічну практику з 2001 року.

Для діагностики лейкозів в повсякденній практиці використовуються прості цитологічні критерії, які доповнюють цитохімічними дослідженнями. В той час як уточнення природи конкретного лейкемічного клону вимагає проведення імунофенотипування та цитогенетичного аналізу. Використовуючи моноклональні антитіла, імунофлуоресцентні та імуноферментні методи, можна більш точно встановлювати нетипові форми та варіанти лейкозів, і, таким чином, застосовувати відповідні протоколи лікування.

Хромосомні аномалії (транслокації, інверсії, делеції тощо), зазвичай, детектуються шляхом диференційного забарвлення хромосом [20]. На сьогодні молекулярно-біологічні методи спираються на використання геномних зондів [21], полімеразної ланцюгової реакції «Real-Time PCR» [22], гібридизації ДНК *in situ* з використанням флуоресцентної мітки (FISH) [20], «PCR in cell» [21] тощо. До ключових переваг використання ДНК-біосенсора для аналізу продуктів ПЛР реакції

над перерахованими методами, що базуються на використанні молекулярних міток належить:

- невисока вартість виготовлення та експлуатації;
- зручність та простота використання, швидкість аналізу;
- висока чутливість та специфічність аналізу;
- вимірювання в режимі реального часу, без використання ферментів та молекулярних міток.

Найчастіше розрив гена *abl* відбувається між альтернативними екзонами 1b та 1a, але трапляються випадки розриву гена *abl* в ділянці після екзону 1a, або до екзону 1b. Таким чином, гібридний ген *bcr-abl* може містити обидва екзони 1b та 1a, або тільки екзон 1a, а може і не містити жодного з них. Але в результаті сплайсингу мРНК Bcr-Abl буде містити тільки екзон a2.

Ген *bcr*, навпаки, має три різних області виникнення розривів (рис. 1.2). В 95% випадків захворювання на ХМЛ і 25-30% гострого лімфобластного лейкозу (ГЛЛ) ген *bcr* має розрив в ділянці довжиною 5,8 тисяч основ, яку було названо *M-bcr* (major breakpoint cluster region). Цей фрагмент містить п'ять екзонів, які традиційно називають b1-b5, що відповідає 12-16 позиції екзона (e12-e16). Більшість розривів відбуваються в інtronі після 13 екзона (b2) або 14 екзона (b3). Таким чином, утворюються гібридні гени з перебудовою e13a2 (b2a2) або e14a2 (b3a2) [23–25]. Крім того, у 20% пацієнтів детектовано обидві форми завдяки альтернативному сплайсингу 14 екзона. В обох випадках мРНК розміром 8,5 тисяч основ кодує послідовність протеїна масою 210 кДа (p210 Bcr-Abl) [24].

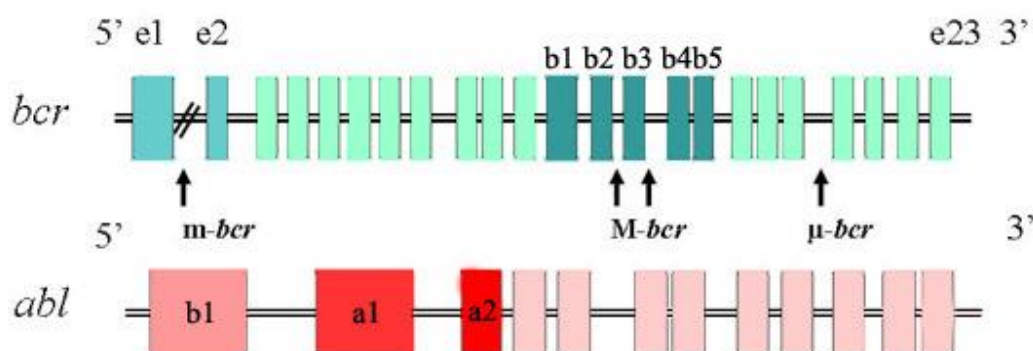


Рис. 1.2. Точки розриву генів *bcr* та *abl*: e1-e23 – екзони гена *bcr*, b1-b5 –екзони ділянки *M-bcr*, 1b, 1a –альтернативні екзони гена *abl*



Інший варіант реалізується в 60% випадків Ph'-позитивної ГЛЛ та деяких випадках ХМЛ і ГМЛ (гострої мієлоїдної лейкемії), тоді розриви гена *bcr* відбуваються в 5'-кінці від *M-bcr*, що названо *m-bcr* (minor breakpoint cluster region). Це інтрон довжиною 54,4 тисяч основ між екзонами e1 і e2. Гібридна мРНК довжиною 7 тисяч основ кодує послідовність протеїна масою 190 кДа (p190 Bcr-Abl) [24].

Третя ділянка розриву, знаходиться на 3'-кінці від *M-bcr* між екзонами e19 і e20 і називається *μ-bcr* (micro breakpoint cluster region). Гібридний ген, що утворюється в результаті такої транслокації, має злиття e19a2, його транскрипція призводить до синтезу протеїна масою 230 кДа (p230 Bcr-Abl) [25].

Крім того, іноді трапляються випадки неканонічних розривів генів *bcr* та *abl*. Їх можна поділити на чотири основні групи. Перша група включає випадки, коли розриви в гені *bcr* відбуваються в інтронних ділянках, що відрізняються від *M-bcr*, *m-bcr* і *μ-bcr*. Так, були детектовані гібриди eба2, e2a2 [26,27].

Друга група являє собою транскрипти, де розриви відбуваються в екзонах: e8a2, e13a2, e15a2 і e2a1 [28–30]. Остання перебудова є єдиним відомим випадком, коли мРНК Bcr-Abl містить будь-яку частину першого екзона гена *abl*.

Третя група – гени, де розриви *bcr* відбуваються в канонічних ділянках, а розриви в гені *abl* – в неспецифічних. Ця група включає в себе такі варіанти транскриптів: e1a3, e13a3, e14a3 [31]. З огляду на це можна визначити, що послідовність протеїна, кодована екзоном a2, не є необхідною для лейкозогенезу.

Четверта група охоплює послідовності, які містять незвичайні вставки, повтори або інвертовані послідовності. Це може бути частина інтрона *bcr* або *abl*, чи послідовність екзона 1b гена *abl* [26, 27]. Такі варіанти гібридних генів знаходять у пацієнтів з агресивною формою хвороби, що дозволяє робити припущення про зв'язок укорочених варіантів *bcr-abl* з більш гострим перебігом захворювання.

Більш детально ознайомитись з поточним станом справ в області пошуку генетичної складової патогенезу при Ph'-позитивних лейкеміях можна ознайомитись в недавньому огляді Череди і Мело в журналі «Annals of Hematology» [32]. Як підсумок, варто наголосити, що на базі цих досліджених механізмів патогенезу можливо розробити метод діагностування ХМЛ. Розробка ДНК-біосенсора для діагностування ХМЛ на ранніх стадіях спирається саме на генетичну особливість її виникнення: 95% випадків цього захворювання супроводжується виникненням патогенного протеїна p210 Bcr-Abl, активність якого може бути подавлена інгібітором тирозин-кінази при

ранньому діагностуванні лейкемії. Виявлення гібридного гену *bcr-abl*, транскрипція якого приводить до появи цього патогенного протеїна, стане запорукою успіху в лікуванні цього захворювання.

Крім того, подальше розширення досліджень, вивчення інших генетично обумовлених лейкемій зможе ввести доповнення в концепцію біосенсора при збереженні більшої частини технічних і концептуальних рішень при його реалізації, дозволити розробити багатоканальну мультидіагностичну систему.

### 1.3. Діагностування стійких до антибіотиків форм туберкульозу на генному рівні

Доповідь Всесвітньої організації охорони здоров'я за 2015 рік [33] стверджує, що в 2014 році у світі приблизно 9,6 мільйонів людей захворіли на туберкульоз, а 1,2 мільйони людей померли від цього захворювання. Однією з головних проблем сьогодні є розповсюдження форм туберкульозу стійких до одного або навіть декількох протитуберкульозних препаратів (МРТБ). В 2014 році у світі було діагностовано приблизно 480 тисяч випадків МРТБ. Можливості лікування МРТБ часто обмежуються малодоступністю і складністю його діагностики. Наприклад, типовий тест резистентності культури *M. tuberculosis* на твердому середовищі займає від 2 до 9 тижнів [34]. Тому розробка надійних, простих і швидких методів діагностики МРТБ є актуальною, важливою задачею сучасної біомедицини.

Секвенування геному різних штамів *M. tuberculosis* і дослідження на молекулярному рівні причин виникнення стійкості до антибіотиків дає можливість пов'язати стійкість до антибіотиків зі структурою деяких генів. Ріфампіцин – антибіотик, отриманий з грам-позитивних бактерій *Amicolatopsis rifamycinica*, є частиною щоденного лікування в рамках традиційного двомісячного курсу протитуберкульозної терапії [35]. Високоєфективна дія цього препарату на *M. tuberculosis* робить його ключовим елементом терапії. Механізм дії і резистентності до нього був широко вивчений на прикладі *Escherichia coli*. Ріфампіцин зв'язується з бета-субодиницею РНК-полімерази, в результаті чого інгібується ініціація транскрипції. Впродовж багатьох років було відомо, що міссенс-мутації і короткі делеції в центральному фрагменті гена, що кодує бета-субодиницю РНК полімерази (*rpoB*), впливають на дію ріфампіцину на *Escherichia coli*. Це розуміння спонукало вивчення

впливів мутацій *rpoB* гена на ефективність дії рифампіцину проти *M. tuberculosis*, тобто вивчення генезису резистентності на генному рівні.

Підсумовуючи аналіз близько 500 геномів стійких до рифампіцину штамів *M. Tuberculosis* на базі даних загальносвітових джерел клінічних випадків захворювання туберкульозом було побудовано схему, представлену на рис. 1.3 [36]. На ній наведені тільки випадки з однією міссенс-мутацією або одиночною інсерцією чи делецією. Поєднання даних наведених в багатьох дослідженнях показало, що 315 з 329 (96%) епідеміологічно непов'язаних штамів *M. tuberculosis* мають 35 різних точкових мутацій, коротких інсерцій або делецій розташованих в 81-основній ділянці, що визначає резистентність штаму до рифампіцину (ДВРР) (фрагмент гену *rpoB* *M. tuberculosis* кодони 507-533). Серед них 43% резистентних штамів мають міссенс-мутацію в кодоні 531(Ser), 36% в кодоні 526(His) мають зміну, яка може привести до заміни амінокислоти в послідовності протеїну. Найбільш частими замінами амінокислот були Ser531Leu(42%) і His526Tyr(23%). Міссенс мутації в кодонах 513, 526 та 531 викликають високу резистентність до рифампіцину, заміна в позиціях 514, 533 зазвичай викликає низьку резистентність [37–39].

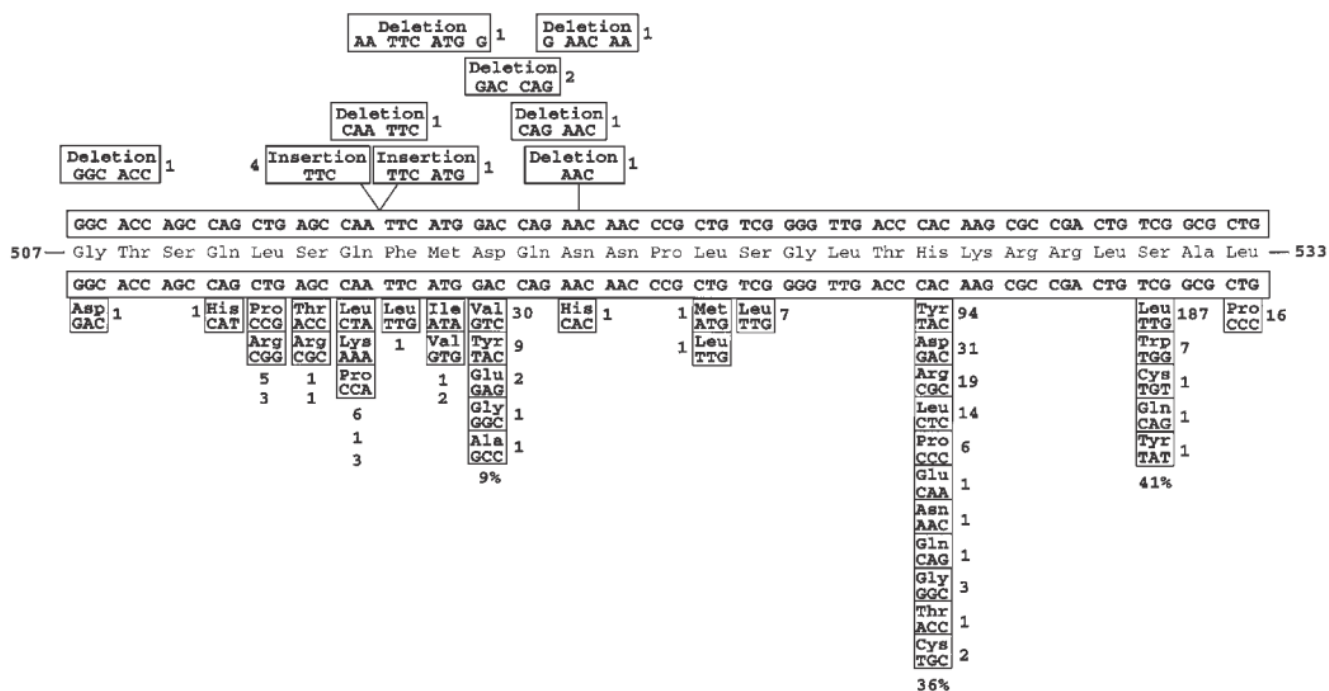


Рис. 1.3. Мутації, розташовані в діапазоні кодонів 507-533 *rpoB* гена *M. tuberculosis*

Таким чином, визначення міссенс-мутацій в кодонах 526 та 531 гену *proV M. tuberculosis* може стати діагностичним критерієм стійкості штаму бактерії до рифампіцину. Відповідно, розробка біосенсора для селективного розпізнавання цих міссенс-мутацій, стане важливим кроком до спрощення діагностики резистентних форм туберкульозу.

#### 1.4. Гібридизаційні ДНК біосенсори

ДНК-сенсорами називають такі біосенсорні пристрої, що використовують послідовності дезоксирибонуклеїнових кислот як селективний матеріал для формування розпізнавального (біоселективного) елемента біосенсора. В широкому сенсі для формування ДНК-сенсора можна застосувати дволанцюгові ДНК (для детектування взаємодій зі специфічними ДНК-зв'язувальними протеїнами або інтеркалюючими речовинами), одноланцюгові олігонуклеотиди певної вторинної і третинної структури в ролі аптамерів і, нарешті, одноланцюгові олігонуклеотиди, первинна послідовність яких не сприяє формуванню внутрішньо-молекулярних зв'язків і, тому такі олігонуклеотиди можуть ефективно гібридизуватися (утворювати міжмолекулярні зв'язки) з комплементарними послідовностями нуклеїнових кислот досліджуваного зразка. Саме процес гібридизації покладено в основу функціонування ДНК-сенсорів для детектування специфічних мутацій в послідовностях нуклеїнових кислот, такий вид ДНК-сенсорів називають гібридизаційними (рис. 1.4).

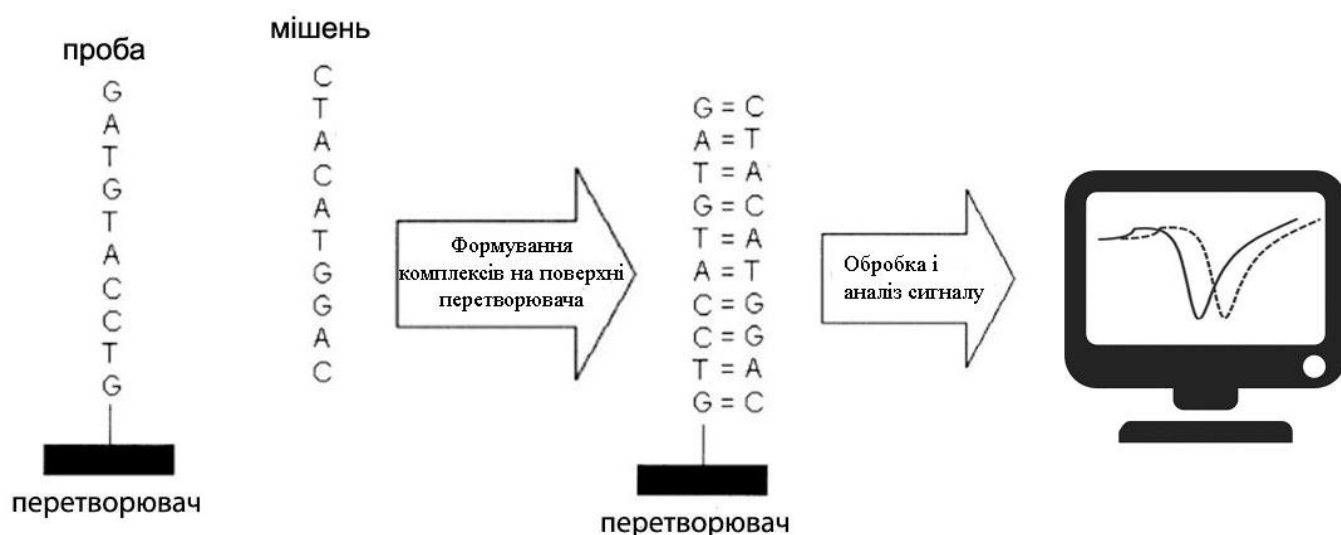


Рис. 1.4. Основний принцип роботи ДНК сенсора

Гібридизаційний ДНК-сенсор складається з фізичного перетворювача та іммобілізованих на його поверхні одноланцюгових олігонуклеотидів певної нуклеотидної послідовності, довжина яких, зазвичай, варіюється від 15 до 50 основ [40]. Внаслідок процесу гібридизації перетворювач формує сенсорний сигнал, який можна отримати і обробити. Механізми формування сенсорного сигналу, в першу чергу, пов'язані з типом фізичного перетворювача і можуть залежати від застосування молекулярних міток (флуоресцентних, ферментних тощо) або можуть бути “label-free”, тобто бути вільними від необхідності їх використання. Такі характеристики біосенсора як його чутливість та селективність, відтворюваність відгуків відчутно залежать від структури саме біоселективного шару, в тому числі, від вибору олігонуклеотиду-проби. Також вагомим фактором виступає густина іммобілізованих проб на поверхні перетворювача. Якщо вона буде занадто високою, можливе виникнення стеричних та інших перешкод, що суттєво погіршать можливість ефективної гібридизації. Крім того, важливо, щоб іммобілізація олігонуклеотиду-проби на поверхні перетворювача відбувалась надійно і таким чином, щоб нуклеотидна послідовність була доступною для гібридизації. Для цього один з кінців олігонуклеотиду-проби модифікують такою функціональною групою, яка б забезпечила надійний зв'язок з поверхнею, і приєднують її до олігонуклеотиду за допомогою спейсера, наприклад  $-(CH_2)_6-$ . Для приєднання до золотої сенсорної поверхні, зазвичай, використовують HS-групи тому, що вони мають високу афінність до золота. Такі модифіковані олігонуклеотиди-проби самозбираються на золотій сенсорній поверхні.

Дослідження структури іммобілізованих одноланцюгових олігонуклеотидів [41] показали, що вони можуть мати декілька точок адсорбції на сенсорній поверхні тому, що нуклеотиди своїми основами взаємодіють з золотом (рис. 1.5а). Результатом цього буде низька частка проб, що можуть брати участь в гібридизації. Щоб запобігти випадковим взаємодіям проб використовують коротколанцюгові тіоли, наприклад, 6-меркапто-1-гексанол (МКГ) для пасивації поверхні золота (рис. 1.5б), який запобігає взаємодії азотистих основ ДНК з поверхнею і захищає її від неспецифічної адсорбції [40]. В результаті змістовні послідовності іммобілізованих одноланцюгових олігонуклеотидів експонуються в розчин і стають доступними для процесу гібридизації.

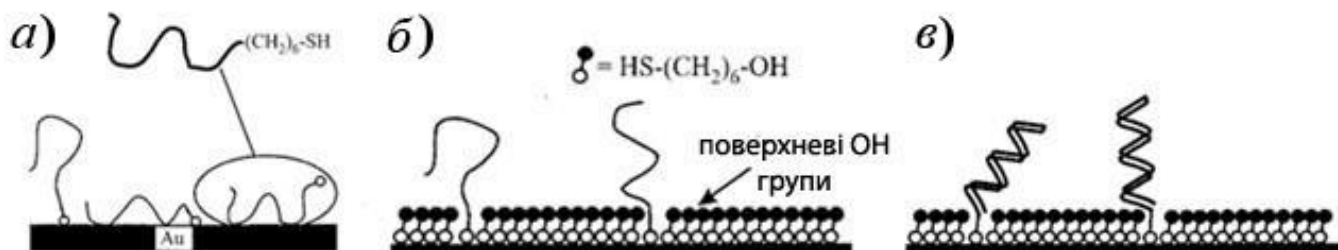


Рис. 1.5. Стадії формування біоселективного шару на золотій сенсорній поверхні:  
 а) іммобілізація ДНК-проб, б) блокування вільних сайтів 6-меркапто-1-гексанолом,  
 в) гібридизація ДНК-мішені

Як було показано в ряді публікацій, визначення наявності тих чи інших мутацій, можна здійснити за допомогою ДНК-сенсора шляхом гібридизаційної дискримінації частково та повністю комплементарних послідовностей нуклеїнових кислот [42–44]. По-справжньому ефективні гібридизаційні ДНК-сенсори повинні бути в змозі розрізнити такі послідовності ДНК, які відрізняються заміною всього однієї нуклеотидної основи. Це може бути досягнуто за рахунок використання різних факторів, що впливають на ефективність гібридизації, в тому числі довжини ДНК-мішені, концентрації, температури, складу буферного розчину для гібридизації, умов післягібридизаційної обробки, а також комбінації таких факторів [45,46].

## 1.5. Принцип роботи біосенсора на базі ППР

### *Поверхневий плазмон-поляритон*

Поверхнева хвиля в плазмі (ПХП), він же поверхневий плазмон-поляритон – це електромагнітна хвиля, що поширюється на межі діелектрика та металу, і поводить себе як квазівільний електрон в плазмі [47]. ПХП – р-поляризована, тобто її вектор магнітного поля  $\vec{H}$  направлений паралельно поверхні. Вона характеризується постійною поширення хвилі ( $\beta$ ) та розподілом електромагнітного поля. Стала поширення хвилі ( $\beta$ ) може бути виражена як:

$$\beta = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_M \epsilon_D}{\epsilon_M + \epsilon_D}}; \quad (1.1)$$

де  $\omega$  - кутова частота;  $c$  – швидкість світла;  $\varepsilon_D$  та  $\varepsilon_M$  - діелектричні константи діелектрика та металу, відповідно (діелектрична константа металу комплексна  $\varepsilon_M = \varepsilon_M' + i\varepsilon_M''$ ). Це рівняння описує поверхневу хвилю в тому випадку, якщо  $\varepsilon_M'$  від'ємна і її абсолютне значення менше  $\varepsilon_D$ . Ця вимога може бути задоволена для декількох матеріалів, але золото серед них використовується найчастіше через свою хімічну стійкість. Реальна та уявна частини постійної поширення хвилі описують періодичність та загасання хвилі в напрямку поширення.

Поверхнева хвиля локалізована на границі метал-діелектрик і загасає експоненційно по обидві її сторони, в кожному з середовищ. Зазвичай, глибина проникнення поля в діелектрик може становити 100-500 нм, загасання поля в металі відбувається відчутно ближче до границі [47]. Тому чутливість до змін діелектричної проникності поширюється тільки на цей невеликий поверхневий шар діелектрика, в ньому і відбуватиметься зв'язування макромолекул, діелектрична проникність яких завжди відчутно більша ніж діелектрична проникність буферного розчину.

Теорія збурень [47] лінійно пов'язує зміну коефіцієнта заломлення  $\Delta n$ , викликану взаємодією аналіту з біоселективним шаром, з реальною частиною сталої поширення хвилі:

$$\operatorname{Re}\{\Delta\beta\} \cong k\Delta n; \quad (1.2)$$

де через  $k$  позначено хвилеве число падаючої хвилі. В випадку взаємодії в тонкому поверхневому шарі  $d$ , що відчутно менше глибини проникнення поля в діелектрик, відповідні зміни в реальній компоненті сталої поширення ПХП будуть такі:

$$\operatorname{Re}\{\Delta\beta\} \cong \frac{2n_s n_f k^2 d}{\sqrt{|\varepsilon_M'|}} \Delta n = Fk\Delta n. \quad (1.3)$$

Де як  $n_f$  і  $n_s$  позначено коефіцієнти заломлення біоселективного шару та об'єму розчину аналіту, відповідно. Викликана зв'язуванням аналіту з поверхнею зміна сталої поширення ПХП ( $\Delta\beta$ ) пропорційна зміні коефіцієнта заломлення та глибині шару, в якому вона спостерігається. Коефіцієнт  $F$  ( $F < 1$ ) виникає в зв'язку з тим, що взаємодія проходить тільки в частині області проникнення поля.

Лінійний зв'язок сталої поширення і коефіцієнту заломлення речовини дозволяє сподіватись на лінійність відгуку біосенсора.

### Збудження поверхневих плазмон-поляритонів

Вперше сенсор на основі поверхневого плазмонного резонансу (ППР) був описаний в 1983 році [48,49]. Спочатку його реалізації були розраховані на роботу з газами, а потім метод був розширений на роботу з рідинами. З того часу сфера використання таких сенсорів, реалізованих у вигляді комерційно доступних приладів, тільки розширювалась і за останні тридцять років дослідники отримали потужний універсальний метод вивчення міжмолекулярних взаємодій [50–52].

В ППР датчиках ПХП збуджується лазерним променем, а її взаємодія з поверхнею є безпосереднім об'єктом дослідження. Збудження ПХП за допомогою світла може бути досягнуто в випадку, коли паралельна поверхні компонента хвильового вектору фотона співпадає з відповідною компонентою ПХП. Це забезпечується за допомогою використання призми, хвилеводу або дифракційної решітки [47].

В конфігурації, що реалізована на базі призми, світло падає з середовища з високою оптичною густиною на межу з плівкою золота. Промінь зазнає внутрішнього відбиття на цій межі (рис. 1.6 а), а в напівпрозорій золотій плівці виникає еванесцентна хвиля. Вона розповсюджується вздовж поверхні з сталою поширення, що залежить від кута падіння променя. Тому підібравши кут падіння можна досягти ефективного збудження ПХП еванесцентною хвилею. Даний метод отримав назву методу ослабленого внутрішнього відбиття (attenuated total reflection).

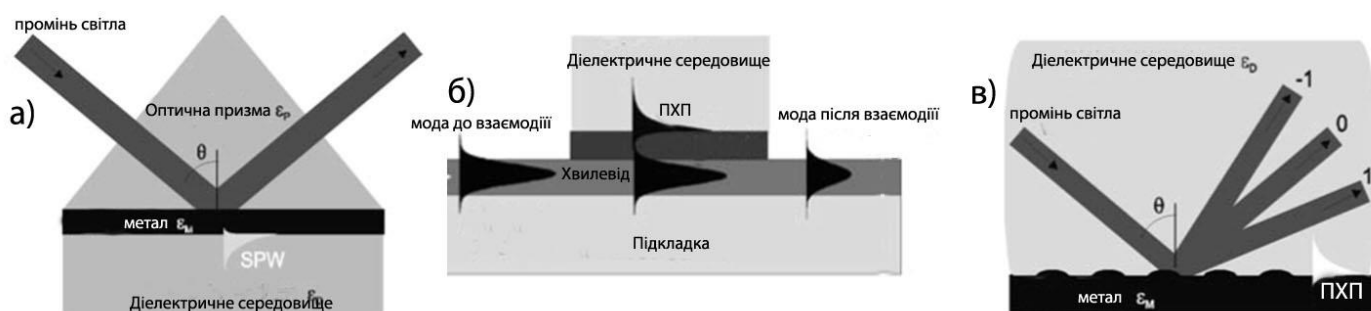


Рис. 1.6. Методи збудження ПХП: а) збудження за допомогою призми (геометрія Отто-Кречмана); б) за допомогою хвилеводу; в) з використанням дифракційної решітки

Процес збудження ПХП в приладах ППР на базі оптичних хвилеводів (рис. 1.6 б) багато в чому аналогічний схемі ослабленого внутрішнього відбиття. Світло направляється хвилеводом і входить в область з тонким металевим шаром на поверхні, поле проникає через шар металу, збуджуючи ПХП на протилежній межі металу.



Особливості взаємодії різних мод з поверхнею досліджуються шляхом моніторингу резонансного поглинання в залежності від частоти.

Крім того, ПХП може бути збуджена з використанням дифракційної решітки (рис. 1.6 в). В цьому випадку паралельна поверхні компонента хвильового вектора дифракційно підсилюється на величину, значення якої пропорційне періоду решітки, і в результаті вона може співпадати з хвильовим вектором ПХП, що і забезпечуватиме резонансне поглинання.

В ППР сенсорах з кутовою модуляцією інтенсивність і довжина хвилі лазера є сталими, а кут, що відповідає найбільш ефективному поглинанню світла ставиться у відповідність процесам взаємодії досліджуваних речовин з поверхнею (вигляд кутової залежності поглинання можна побачити на рис. 1.7 а, верхній графік).

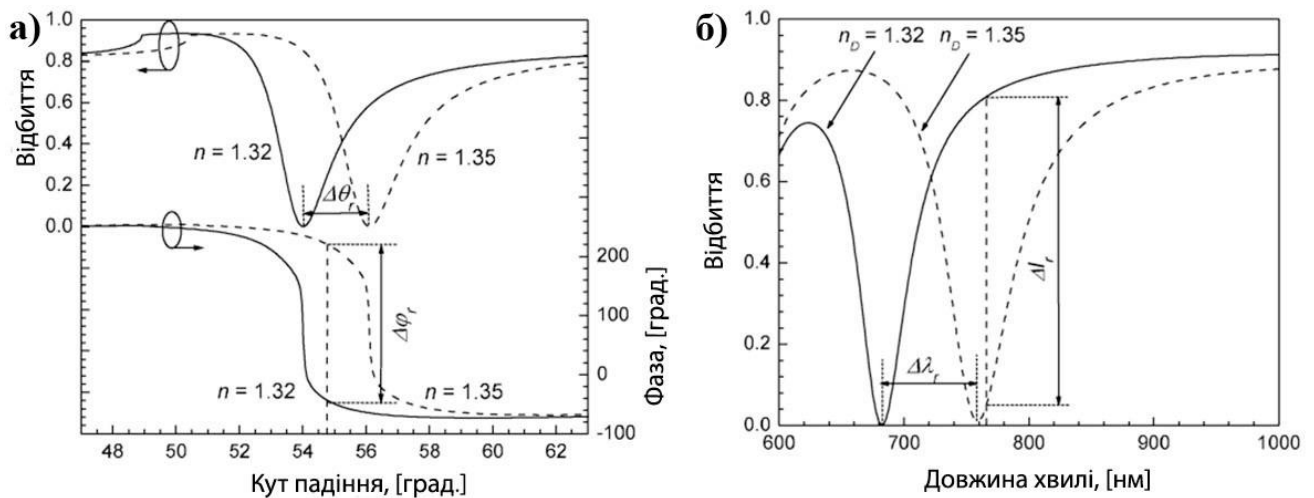


Рис. 1.7. Залежності коефіцієнта відбиття та фази хвилі світла, що взаємодіє з поверхнею при збудженні ППР в геометрії Отто-Кречмана: а) при модуляції кута падіння світла; б) при модуляції довжини хвилі

В сенсорах ППР з модуляцією по довжині хвилі резонансні умови поглинання підбираються шляхом зміни довжини хвилі ( $k=2\pi/\lambda$ ) при незмінному куті падіння (приклад діаграми, що відповідає такому методу отримання ППР наведено на рис. 1.7 б). В сенсорах ППР з фазовою модуляцією довжина хвилі зберігається незмінною і відслідковується залежність фази відбитого світла від кута падіння (рис. 1.7 а), нижній графік). Зміни в поляризації ППР вимірюються при сталих куті та довжині хвилі.

Взаємодія світла і ПХП може впливати на такі характеристики відбитого світла як поляризація, амплітуда, фаза та спектральний розподіл хвильового пакету. Принцип біосенсорного детектування на базі наведених перетворювачів буде полягати в пошуку відповідності між взаємодією макромолекул з сенсорною поверхнею та зміною якоїсь з цих величин. Найбільш широко з розглянутих методів використовується збудження ПХП за допомогою призми. Найвідоміша комерційна реалізація цього методу була зроблена шведською фірмою “Biacore”, яка в 2006 році була викуплена за 390 мільйонів доларів і увійшла до складу американського концерну “General Electric Healthcare”.

В Україні існують власні розробки в цій області, на базі інституту фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України була розроблена серія приладів «Плазмон». Прилад «Плазмон б», що був використаний в цій роботі, концептуально не відрізняється від «Biacore T200», вони являються реалізаціями одного і того ж методу в різних класах приладу. Головні переваги “Плазмон б” – це його простота і портативність, поєднані зі значно меншою ціною приладу і витратами в експлуатації. В той же час, «Biacore T200» – дорогий прилад, з дорогими розхідними матеріалами, не портативний, але більш захищений від впливу випадкових факторів. З цієї причини він дещо більш чутливий і має вищу точність.

#### *Використання поверхневого плазмонного резонансу*

Сенсограма ППР є основною інформативною кривою при аналізі біологічних процесів, що проходять в комірці. Якщо сам біоселективний шар і утворювані з ним комплекси аналіту лежать в межах еванесцентного поля поверхневого плазмон-поляритона, біосенсор на базі ППР буде працювати ефективно і аналіз його сенсограми буде репрезентативним.

Присутність аналіту може приводити до зворотніх та незворотніх змін в структурі біосенсорного шару, які добре відображає кут резонансу ППР. І загалом існує 3 варіанти ходу сенсограми, що пов’язуються з процесами в біоселективному шарі:

1. Аналіт не зв’язується з біоселективним шаром на поверхні, але його присутність впливає на відгук ППР, бо його коефіцієнт діелектричної проникності впливає на поле ПХП. Промивка буферним розчином повертає базову лінію в початкове положення.

2. Аналіт утворює слабкий комплекс з іммобілізованим шаром матеріалу, цей комплекс може частково дисоціювати при промивці зразка буферним розчином, а сам біоселективний шар може бути регенерований.
3. Утворений комплекс може бути стійким, а регенерація біосенсора неможливою.

Дослідження за допомогою ППР допомагає відслідкувати динаміку утворення комплексів, відрізнити сильні міжмолекулярні взаємодії від слабких та отримати кількісні характеристики кожної з них.

Сигналом являється відгук перетворювача на внесення аналіту, який прямо пов'язаний з впливом присутності цільової речовини в вимірювальній комірці. Шумом називається випадковий відгук (незалежний від присутності аналіту), що виникає в системі під дією зовнішніх факторів і може спотворювати корисний сигнал. Шуми часто мають різну природу і пов'язуються з рядом впливів, наприклад, неповна ідентичність буферних розчинів (зразку і робочого буфера) викликає скачки сигналу при введенні зразка, пов'язані з дещо різною концентрацією солей або температурою розчину. Похибки, що виникають при апроксимації і обробці кривої ППР в околі мінімуму також спричиняють шум. Крім шуму на діаграмі ППР може бути присутній дрейф, основна різниця між дрейфом і шумом полягає в тривалості процесу. Дрейфом являється поступовий, тривалий в часі процес, що спотворює сигнал. Дрейф може бути викликаний рядом "паразитних" процесів в системі, наприклад нагріванням або охолодженням комірки при зупинці потоку досліджуваної речовини. Іноді під тиском, що створює насос, можуть виникати маленькі бульбашки газу. Поверхневі хвилі дуже чутливі навіть до найдрібніших з них, тому дрейф, пов'язаний з їх виникненням може бути критичним для якості вимірювань. Перед початком вимірювань важливо мінімізувати дрейф, бо часто саме він є лімітуючим фактором для точності біосенсора ППР.

На рис. 1.8 зображено типову сенсограму ППР, що відображає процес афінних взаємодій. З її допомогою можна дослідити кінетику процесів, що проходять у вимірювальній комірці. Спочатку при промиванні біосенсорного шару буферним розчином важливо мінімізувати дрейф і добитися стабільності базової лінії (рис. 1.8). Введення досліджуваного зразку викликає утворення міжмолекулярних комплексів (стадія асоціації), що можна спостерігати на сенсограмі в рамках зростаючої ділянки. Через деякий час сенсорний сигнал виходить на насичення, яке визначає кількість комплексів, що утворюються при введенні даної концентрації аналіту.

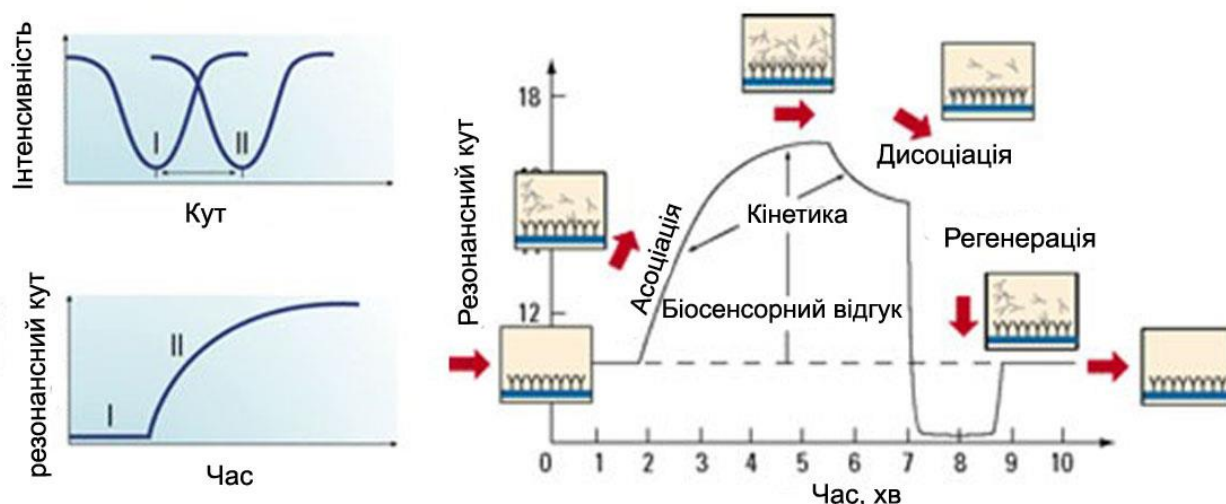


Рис. 1.8. Приклад використання сенсограми ППР для аналізу афінних взаємодій

Після введення зразка промивання вимірювальної комірки буферним розчином викликає дисоціацію, що пов'язана з порушенням рівноваги між асоціацією і дисоціацією в сторону розпаду міжмолекулярних комплексів. Для багаторазового використання біосенсорної поверхні необхідне відновлення початкового її стану. Це може бути досягнуто шляхом підбору ренатуруючого розчину, який зможе забезпечити розпад комплексів і повернення сенсора в початковий стан.

Класичним представником ППР сенсора з кутовою розгорткою є розроблений в інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова прилад «Плазмон-6». Він поєднує в собі простоту в використанні, продуктивність і можливість одночасної роботи з двома каналами.

В даній системі компактно суміщено декілька модулів: модуль оптичного блоку, модуль обертання призми, базовий модуль керування ППР сенсором.

Оптичний блок складається з лазера, що вбудований в його основу, лазерний промінь поступає на напівпрозоре дзеркальце і ділиться навпіл, утворюючи два промені. Перший опорний промінь рухається на перший детектор, який визначає інтенсивність лазерного пучка. Другий промінь проходить через призму, падає на поверхню металевої плівки, збуджує ПХП, відбивається від заднього дзеркальця призми та повертається в оптичний блок. В оптичному блоці цей промінь відбивається від дзеркальця і попадає на другий детектор. Прилад визначає частку інтенсивності відбитого пучка, до його початкової інтенсивності і будує криву ППР. Мінімум цієї

залежності інтенсивності від кута відповідає умові резонансу. Забезпечивши вимірювання такої кривої, можна побудувати залежність кута ППР від часу і отримати сенсограму, що відображає динаміку стану сенсорної поверхні [53].

Метод ППР являється, мабуть, найгнучкішим і найпопулярнішим серед всіх біосенсорних методів для кількісного та якісного дослідження міжмолекулярних взаємодій [54]. Через колосальну роль, яку грають ДНК в процесах життєдіяльності багато дослідників спробували розробити ДНК-сенсори (геносенсори) для детектування їхніх специфічних послідовностей. Існує ряд комерційно доступних спектрометрів ППР, які були успішно використані з цією метою: «Spreeta» [55], «Laboratory SPR» [56], «SENSIA SL» [57], «Biacore X» [58], «AutoLab ESPRIT» [59], «Плазмон» [60]. Кожен з наведених спектрометрів здатний забезпечити в реальному часі без використання молекулярних міток дослідження кінетики міжмолекулярних взаємодій. В процесі вивчення взаємодії коротких пар олігонуклеотидів (17-25 пар основ) їх межа детектування становить від 0,5 до 20 нМ [54–60].

Для того щоб покращити межу детектування можна використати молекулярні мітки, реалізувавши схему «сандвіч аналізу». Відповідно до неї після гібридизації ДНК-мішені і олігонуклеотида-проби з вільним негібридизованим кінцем ДНК-мішені взаємодіє олігонуклеотид з молекулярною міткою, утворюючи трьохкомпонентний «сандвіч». Прикладом такої мітки може бути будь-який «яскравий» об'єкт, наприклад, НЧЗ.

## **1.6. Принцип роботи біосенсора на базі електрохімічної імпедансної спектроскопії**

### *Що таке електрохімічна імпедансна спектроскопія?*

Електрохімічна імпедансна спектроскопія (ЕІС) є потужним методом дослідження електрохімічних процесів у широкому діапазоні частот змінної напруги. Вона інтенсивно використовується для дослідження механізмів корозії, процесів переносу зарядів через границю з розчином, оптимізації хімічних джерел постійного струму. В галузі біосенсорів ЕІС вдало застосовують для детектування зв'язування макромолекул на поверхні перетворювача. Перші публікації про використання ЕІС були зроблені в 1980х роках, а недавнє зростання їх числа пов'язане з новітнім розвитком і комерційною доступністю мультифункціональних вимірювальних систем

[61], які дозволяють проводити швидкі, високопродуктивні та зручно автоматизовані вимірювання.

Імпеданс це комплексне число, що визначається часткою змінної напруги до змінного струму. Це число виражається модулем  $|Z|$  і фазовим кутом  $\varphi$ , або може бути представленим сумою реальної ( $Z_R$ ) і уявної компоненти ( $Z_{Im}$ ). Якщо прикладену напругу виразити як  $V_{test} = V_{DC} + V_{AC} \sin(\omega t)$ , а результуючий струм як  $I_{test} = I_{DC} + I_{AC} \sin(\omega t - \varphi)$ , тоді імпеданс  $Z(\omega)$  буде мати модуль  $V_{AC}/I_{AC}$  і фазу  $\varphi$  (рис. 1.9). Значення постійної напруги  $V_{DC}$  також опосередковано впливає на імпеданс, що добре видно при використанні електрохімічних маркерів. Вимірювання імпедансу проводять на різних частотах, утворюючи спектр  $Z(\omega)$ , який характеризує досліджувану систему. Для вимірювань спектрів необхідні по меншій мірі два електроди – робочий електрод та допоміжний електрод для забезпечення замкненого електричного ланцюга, але, як правило, використовують 3-електродну схему. Третій електрод з постійним потенціалом, наприклад, хлорсрібний є електродом порівняння. З його допомогою встановлюють бажану, чітко визначену напругу між робочим електродом і розчином [62].

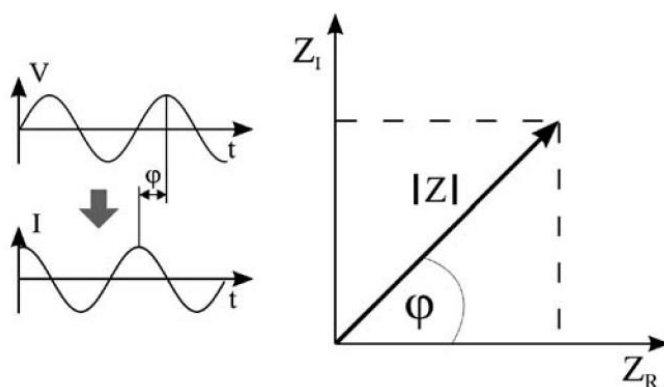


Рис. 1.9. Графіки залежностей напруги і струму від часу та векторна діаграма імпедансу побудована на їх основі

Спектр імпедансу, який ми отримуємо таким чином, може бути змодельований еквівалентним електричним колом. Воно ставиться у відповідність процесам переносу заряду на поверхні, транспорту через біоселективний шар та в поверхневому дифузійному шарі. Отримане таким чином еквівалентне електричне коло виконує двояку функцію: з однієї сторони – описову (являється еквівалентною заміною комірки); з іншої сторони – аналітичну. Аналітична функція пов'язана з можливістю

поставити у відповідність деякому електрохімічному процесу в комірці, один елемент еквівалентної схеми, і по його значенню відслідковувати динаміку процесу. Даний підхід має комплексно охарактеризувати систему для подальшого спрощення процедури вимірювання, вибору найбільш чутливого діапазону частот [62].

#### *Фарадеївські і нефарадеївські поверхневі процеси*

Важливо розуміти різницю між фарадеївськими і нефарадеївськими біосенсорами, так як вони базуються на відчутно різних електрохімічних процесах. Фарадеївським являється такий процес, що передбачає перенесення заряду через поверхню. В випадку фарадеївської імпедансної спектроскопії окисно-відновна реакція відбувається безпосередньо на поверхні електроду, вона полягає в обміні електроном між іонами, що дифундують з розчину до поверхні, і металевим електродом. Тому біосенсор на базі фарадеївської ЕІС часто вимагає додаткового використання окисно-відновних індикаторів та вибору значення постійного потенціалу реакції. Цей біосенсор зазвичай працює на низьких частотах, де чутливість імпедансу до зміни стану поверхні максимальна.

У випадку нефарадеївських процесів змінний струм може протікати через поверхню без переносу заряду (найпростішим прикладом є зарядка і розрядка конденсатора). В описі нефарадеївського біосенсора часто використовується термін ємнісний біосенсор, він зазвичай працює на сталій високій частоті (більше десяти кГц), де вклад поверхневої ємності в імпеданс системи вносить ключове значення.

#### *Вибір еквівалентної схеми*

Результати вимірювань імпедансу використовуються для обчислень значень елементів еквівалентної схеми. Вона в загальному випадку не мусить базуватись на симуляції один в один процесів, що проходять в системі [63], навіть найкращі моделі систем біосенсор-розчин часто дають суттєве розходження в певних діапазонах частот. Цілком прийнятно, якщо вона виконуватиме описову і аналітичну функції, які головним чином полягають в зручності опису системи еквівалентною схемою і певним її ключовим елементом імпедансу. Нелінійний метод найменших квадратів [64] використовується для моделювання модуля та фази імпедансу в широкому діапазоні частот. Існують як безкоштовні (наприклад LEVM), так і платні (наприклад ZView, ZSimpWin, ZFit) варіанти його програмної реалізації. Інтерпретування спектрів імпедансу іноді буває більшою мірою мистецтвом ніж наукою, пошук границі між ними окреме складне питання [65].

Рис. 1.10 демонструє два найтипівіших приклади спектрів імпедансу фарадеївського і нефарадеївського процесу [66] і еквівалентні схеми, що їх моделюють. Опір розчину  $R_{sol}$  відповідає високочастотній провідності, він зумовлений рухливістю іонів в розчині. Поверхнева ємність  $C_{surf}$  є ключовим елементом імпедансу на середніх частотах 1кГц-10кГц. Вона розглядається як суперпозиція послідовно з'єднаної ємності поверхневої модифікації та ємності подвійного шару.

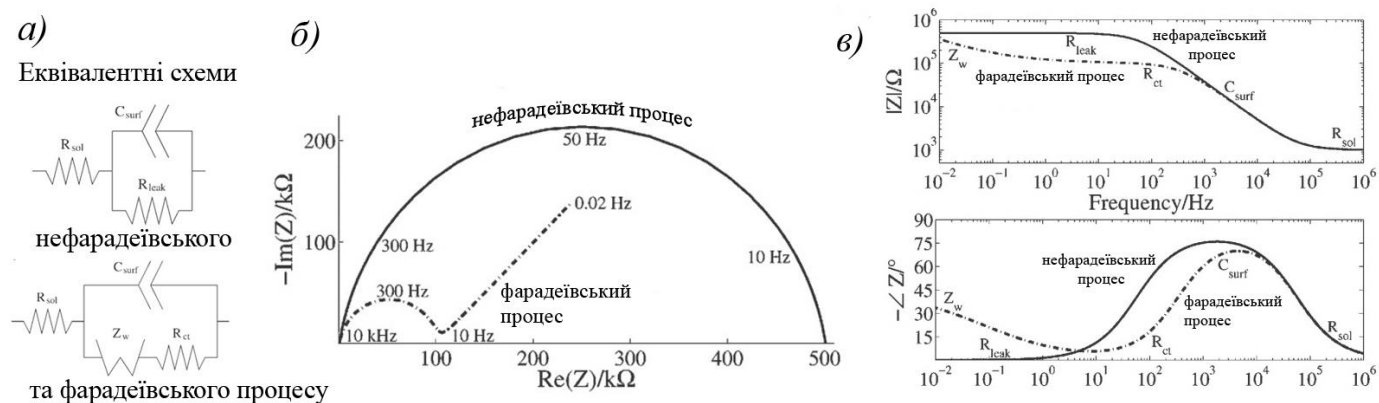


Рис. 1.10. Типові еквівалентні схеми, що відповідають нефарадеївському та фарадеївському процесу (а), спектри імпедансу для цих процесів в вигляді діаграми Найквіста (б) та залежностей амплітуди і модуля імпедансу від частоти (в)

Компонента пов'язана з модифікацією залежить від поверхневої густини іммобілізованого матеріалу і його діелектричної проникності. Її можна представити як плоский конденсатор ємністю  $C = \epsilon_r \epsilon_0 A/t$ , де  $\epsilon_r$  – діелектрична проникність,  $A$  – площа електрода і  $t$  – товщина діелектричного шару. На частотах порядку кількох герц починають проявлятися елементи, що шунтують поверхневу ємність ( $R_{ct}$  та  $R_{leak}$ ). З подальшим зменшенням частоти вони перебирають на себе основну роль в переносі заряду. В випадку фарадеївського процесу на низьких частотах буде спостерігатися наростання ролі імпедансу елемента Варбурга  $Z_w$ , він відображає затримку, окисно-відновних маркерів в дифузії до поверхні електрода [62]. Ця затримка приводить до виникнення повороту фази в  $45^\circ$  і є доволі помітною на діаграмі Найквіста. Опір переносу заряду ( $R_{ct}$ ) приводить до появи різниці між потенціалом напівреакції та потенціалом при якому реально спостерігається окисно-відновна реакція, він ставиться у відповідність потенціальному бар'єру, що створює транспортні обмеження в наслідок електростатичного відштовхування або появи стеричних перешкод.



Ключову роль в цих моделях спектрів імпедансу афінних біосенсорів грають опір переносу заряду ( $R_{ct}$ ) та поверхнева ємність  $C_{surf}$ . Оскільки вони в абсолютній більшості випадків пов'язуються з кількістю речовини, що вступила в взаємодію з біосенсорним елементом, бо відповідають ємності іммобілізованого матеріалу або обмеженням в поверхневій провідності, яку спричиняє іммобілізація.

#### *Ємність подвійного шару*

Якщо електрод поляризований (нефарадеївський процес), то він притягує іони протилежного заряду до поверхні, а випадковий тепловий рух врівноважує цей процес. Електричне поле, що створює електрод, експоненційно загасає з збільшенням відстані, так як ці іони поступово його екранують. Характерна довжина загасання, довжина Дебая, пропорційна квадратному кореню концентрації іонів [67]. Даний ефект створює ємність, що називається ємністю подвійного шару або ємністю шару дифузії.

Таке впорядкування іонів відносно площини електроду еквівалентно наявності плоского конденсатора товщиною в довжину Дебая (близько 1 нм) [68], а ємністю порядку 70 мФ/см<sup>2</sup>. Іони, адсорбовані на поверхні голого електроду, збільшують поверхневу ємність відповідно до моделі Гуї-Чапмана-Штерна (Gouy-Chapman-Stern) [69]. Необхідно зауважити, що ємність цього шару залежить від напруги на електроді. Якщо діелектричний шар на поверхні покриває електрод, утворюючи додаткову ємність, то ємність подвійного шару зазвичай добудовується послідовно до неї. При розробці імпедансних біосенсорів характеристики подвійного шару ніколи не повинні грати відчутної ролі для кожного з типів біосенсорів. Ємність подвійного шару відчутно більша послідовної їй ємності біосенсорного шару (а отже вона шунтується) в випадку нефарадеївських біосенсорів, в той час як у фарадеївських біосенсорах домінує гілка пов'язана з  $Z_w$  і  $R_{ct}$  у найбільш важливій області низьких частот [66].

#### *Елемент Варбурга*

В 1899 році Е. Варбург [70] опублікував його знамениту працю, яка вивчала імпеданс дифузійного транспорту окисно-відновних маркерів поблизу поверхні електроду. Його головна заслуга була в тому, що він правильно вибрав граничну умову на поверхні електроду ( $x=0$ ), що задавала концентрацію маркерів рівну нулю (повна відсутність переносу маси). Хоча вчений і не зумів розв'язати дифузійне рівняння і отримати сучасний вигляд функції імпедансу, але вона стала називатись його іменем.

$$Z_w = \frac{\sigma}{\omega^{1/2}} - \frac{j\sigma}{\omega^{1/2}}, \text{ де } \sigma \text{ визначається як } \sigma = \frac{(\partial I / \partial C_0)_{E, C_R}}{\eta FAD_0^{1/2} \sqrt{2} (\partial I / \partial E)_{C_0, C_R}} + \frac{(\partial I / \partial C_R)_{E, C_0}}{\eta FAD_R^{1/2} \sqrt{2} (\partial I / \partial E)_{C_0, C_R}}. \quad (1.4)$$

В цьому записі  $D_0$  і  $D_R$  коефіцієнти дифузії молекул речовин що окислюються і відновлюються,  $A$  – площа електрода. Часткові похідні  $(\partial I/\partial C_0)_{E,C_R}$ ,  $(\partial I/\partial C_R)_{E,C_0}$ ,  $(\partial I/\partial E)_{C_0,C_R}$  можуть бути виражені з стехіометрії реакції та через її рівноважні константи. В випадку реакції типу  $O + ne^- \xrightleftharpoons[k_b]{k_f} R$  вираз набуває виду:

$$Z_W = R_{ct} \left( 1 + \frac{k_f th(\delta_N \sqrt{j\omega D_0})}{\sqrt{j\omega D_0}} + \frac{k_b th(\delta_N \sqrt{j\omega D_R})}{\sqrt{j\omega D_R}} \right). \quad (1.5)$$

В цьому виразі  $th$  – гіперболічний тангенс,  $k_b$  та  $k_f$  – кінетичні константи прямої і зворотної реакції,  $\delta_N$  товщина дифузійного шару Нернста. Варто зауважити, що цей вираз може бути повністю справедливим тільки в випадку «напівнескінченної» дифузії до плоскої поверхні електрода, при тому система повинна перебувати в стані динамічної рівноваги. Більш детально з історією і застосуваннями цієї моделі можна ознайомитись в літературі [63].

#### *Елемент постійної фази*

Відомо, що ємність поблизу поверхні суцільних планарних електродів не повністю відповідає імпедансу плоского конденсатора, внаслідок чого емпіричним шляхом виникла модель елемента постійної фази (ЕПФ).

Імпеданс ЕПФ визначається аналогічно імпедансу плоского конденсатора:

$$Z_{CPE} = \frac{1}{A(j\omega)^\alpha}, \quad (1.6)$$

де  $A$  – певний аналог ємності,  $\omega$  – кутова частота та  $\alpha$  деяке число  $0,5 < \alpha < 1$ . В граничному випадку, коли  $\alpha=1$  – даний елемент зводиться до простого ємнісного імпедансу, а коли  $\alpha=0,5$  – цей елемент перетворюється в елемент Варнбурга. Проте типове його значення при моделюванні суцільних плоских електродів, зазвичай, варіюється в діапазоні від 0,85 до 0,98 [66]. Зрозумілим наслідком сказаного є те, що ЕПФ забезпечує фазовий зсув між напругою і струмом, фаза імпедансу, зазвичай, дещо менше  $90^\circ$ . Тобто крім чисто реактивної компоненти імпеданс буде містити і активну. Подібну поведінку електродів пояснюють неоднорідностями в поверхневій ємності. Існує ряд робіт, що можуть бути корисні при більш детальному вивченні цього питання, наприклад в огляді опублікованому Пайкосі [71] переконливо продемонстровано зв'язок мікроскопічних неоднорідностей адсорбції, що породжують неоднорідність розподілу поверхневого струму, з моделлю імпедансу ЕПФ. У

результаті зауважимо, що поверхню суцільного планарного електроду розумно моделювати ЕПФ елементом. Моделювання простим конденсатором допустиме, але може приводити до погіршення якості наближення [66].

### *Механізм селективного розпізнання ДНК за допомогою EIS*

При використанні методу фарадеївської електрохімічної імпедансної спектроскопії, зазвичай, опираються на дослідження електронно-обмінних процесів поблизу поверхні перетворювача. Їх необхідно пов'язати з формуванням дволанцюгової ДНК в ході процесу гібридизації і виразити сигнал через один з елементів еквівалентної схеми Рендлеса, яка буде використана для опису системи.

Еквівалентна схема Рендлеса (рис. 1.11 а) є найзручнішою і найпопулярнішою для моделювання фарадеївських процесів на поверхні електрода. Вона складається з опору об'єму електроліту ( $R_e$ ), поверхневої ємності, яка являє собою неідеальний конденсатор, представлений елементом постійної фази (CPE) поверхневого опору, пов'язаного з переносом заряду ( $R_t$ ) та елементу Варбурга ( $Z_w$ ), що відповідає дифузії іонів з об'єму до поверхні.

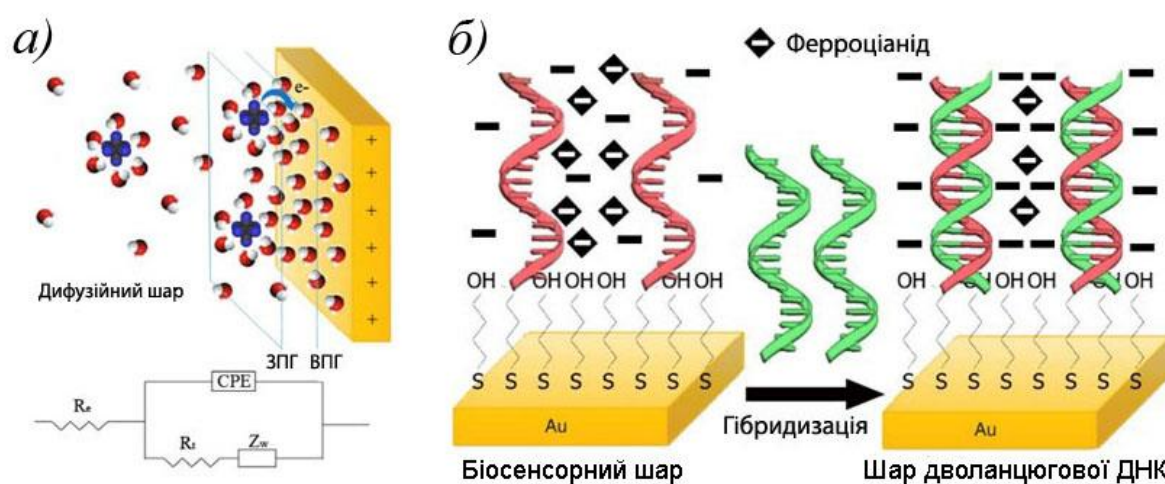


Рис. 1.11. Структура подвійного шару на поверхні робочого електроду (а) та еквівалентна схема, що їй відповідає, та будова шару іммобілізованого матеріалу (б) на поверхні робочого електроду до і після гібридизації з комплементарними послідовностями

Дана схема описує подвійний шар на поверхні робочого електроду. Поверхневі іони обмежені внутрішньою (ВПГ) і зовнішньою площиною Гельмгольца (ЗПГ), з

одного боку, та поверхнею електроду, з іншого, відповідають СРЕ елементу. Опір ( $R_t$ ), безпосередньо пов'язаний з перешкодами переносу електрону між поверхнею робочого електрода і поверхневими іонами гексаціанофератів, які в свою чергу залежать від процесу гібридизації олігонуклеотидів, іммобілізованих на робочому електроді, та комплементарних їм цільових олігонуклеотидів, які можуть знаходитися в досліджуваному розчині.

Рис. 1.11 б) демонструє механізм детектування процесу гібридизації в присутності гексаціанофератів. Цей процес супроводжується появою біля поверхні робочого електрода додаткових негативних зарядів фосфатних залишків цільових олігонуклеотидів. Таке ущільнення негативно зарядженого приповерхневого шару створює додатковий потенціальний бар'єр на шляху іонів  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ , що лімітує провідність домінуючої іонної компоненти. Саме це електростатичне відштовхування і є базовим ефектом для детектування гібридизації ДНК на поверхні робочого електрода за допомогою ЕІС. Воно виражається в зростанні потенціального бар'єру, який необхідно подолати іону, щоб досягнути електрода і взяти участь в окисно-відновній реакції. В рамках еквівалентної схеми Рендлеса це зростання потенціального бар'єру впродовж гібридизації виражається у збільшенні поверхневого опору ( $R_t$ ).

Електрохімічні біосенсори забезпечують легку, швидку, точну, високочутливу та специфічну процедуру вимірювання [72]. Крім того, завдяки можливостям сучасної мікроелектроніки, масове виробництво різноманітних електрохімічних перетворювачів та інших компонентів біосенсорів робить їх здатними до мініатюризації, дешевими і доступними як для виробників, так і для кінцевого споживача.

Можливість електрохімічного детектування процесу гібридизації ДНК без використання молекулярних міток було показано як за допомогою робочого електрода - пластинки [73], так і за допомогою гребінчастих електродів [74], але завдяки більшій активній площі суцільні електроди, як правило, демонструють значно вищу чутливість: якщо гребінчастий електрод давав можливість працювати в мікромольному діапазоні концентрацій олігонуклеотидів, то суцільний планарний електрод – в наномольному. Аналогічно, доволі високу концентрацію олігонуклеотидів (1 мкМ) детектували за допомогою гребінчастого електрода, суміщеного з сенсором на основі поверхневого плазмонного резонансу [75].

Як наслідок створення імпедіометричного ДНК біосенсора з перспективою подальшої розробки на його основі простого, дешевого, придатного до масового

виробництва кондуктометричного сенсора перетворюється в доцільну і посильну задачу.

## 1.7. Висновки

Даний розділ містить викладення двох проблем медичної діагностики, що можуть бути вирішені шляхом розробки ДНК-сенсорів:

1. розпізнання резистентних форм туберкульозу для радикального пришвидшення його діагностики;
2. точне діагностування хронічної мієлоїдної лейкемії (ХМЛ) особливо важливе в силу наявності багатьох шляхів патогенезу, пов'язаних з формуванням різних протеїнів (p190 Bcr-Abl, p210 Bcr-Abl, p230 Bcr-Abl) з транскрипту гібридного гену *bcr-abl*, утвореного в Ph' хромосомі.

В кожному з випадків був проведений аналіз наукових публікацій, направлених на пошук генетичних механізмів виникнення стійкості до рифампіцину у бактерії і виникнення ХМЛ у людини. Головною задачею цього аналізу був пошук діагностичного критерію для розпізнавання резистентних форм туберкульозу та діагностування ХМЛ. І такі закономірності було знайдено. 95% випадків ХМЛ викликані розривом в *M-bcr* ділянці при формуванні гібридного гену *bcr-abl*, цей ген відповідає за формування патогенного протеїна p190 Bcr-Abl, появу якого можна передбачити. Резистентність *M. tuberculosis* до рифампіцину чітко пов'язується з виникненням мутацій в *rpoB* гені. Мутація в 531 кодоні TCG→TTG (Ser 531-Leu) гену *rpoB* викликає сильну стійкість бактерії до протитуберкульозного препарату першої лінії рифампіцину, швидке її виявлення здатне запобігти помилкам в лікуванні туберкульозу. Також важливою є заміна в кодоні 526(His), це друга по частоті появи місенс-мутація, що також приводить до виникнення резистентності штаму до рифампіцину, разом ці дві заміни викликають близько 85% випадків стійкості до антибіотика. Вдале визначення цих мутацій дозволяє надійно передбачити стійкість штаму збудника туберкульозу і забезпечити правильне лікування туберкульозу на ранніх стадіях.

Для реалізації цих завдань доцільно створити ДНК-біосенсиори, використовуючи методи ППР та ЕІС, тому зроблено огляд можливостей кожного з цих методів та особливостей їхнього використання.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

#### 2.1. Реактиви

У роботі було використано такі одноланцюгові олігодезоксирибонуклеотиди, синтезовані Metabion International AG (Germany):

- модифікований на 5'-кінці SH-групою для іммобілізації на золотій сенсорній поверхні *mod-Ph* (HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-GCT GAA GGG CTT TTG AAC TCT GCT), що є фрагментом від'ємного ланцюга, комплементарного гібридному гену *bcr-abl*;
- *P1* (AGC AGA GTT CAA AAG CCC TTC AGC) - повністю комплементарний до *mod-Ph*;
- частково комплементарний до *mod-Ph* олігонуклеотид *Vcrex14* (CCA CTG GAT TTA AGC AGA GTT CAA), який є фрагментом нативного гену *bcr*;
- та частково комплементарний до *mod-Ph* олігонуклеотид *BA190* (ATG GAG ACG CAG AAG CCC TTC AGC), який є фрагментом нативного гену *abl*.

Також використовували одноланцюгові олігодезоксирибонуклеотиди, синтезовані IBA GmbH (Німеччина):

- модифікований на 5'-кінці SH-групою для іммобілізації на золотій сенсорній поверхні *P2* (HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-ACC CAC AAG CGC CGA CTG TTG), що відповідає фрагменту гену *rpoB M. Tuberculosis* з міссенс мутацією в 531 кодоні;

- *T2* (CAA CAG TCG GCG CTT GTG GGT) - повністю комплементарний до *P2* і відповідає від'ємному ланцюгу, комплементарному до гена *groB* з мутацією в 531 кодоні;
- *T2-18m* (HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CAA CAG TCG GCG CTT GTG) має ту ж послідовність, що і *T2*, але модифіковану на 5'-кінці SH-групою для іммобілізації на золотій поверхні і зменшену на три нуклеотида на 3'-кінці;
- *TN* (CGA CAG TCG GCG CTT GTG GGT), відмінний від *T2* однією однонуклеотидною заміною і являє собою фрагмент від'ємного ланцюжка комплементарного до нормального, немутованого гена *groB* *M. tuberculosis*;
- *TC* (GCT ATC AGC CAC GAA CAC CCA), що випадковою, некомплементарною до *P2* послідовністю.

Крім олігонуклеотидів в роботі були використані такі реактиви:

- одноосновний фосфат калію «Fluka» (Швейцарія);
- 6-Меркапто-1-гексанол (МКГ) «Sigma-Aldrich» (Франція);
- SSC буфер 20 кратної концентрації (300 мМ цитрат натрію, 3 М хлорид натрію, рН 7), отримано від «Sigma-Aldrich» (Франція);
- Двохосновний фосфат натрію виробництва «Merck» (Німеччина);
- Гексаціаноферат (II) калію тригідрат, гексаціаноферат (III) калію «Fluka» (Швейцарія);
- Всі розчини були приготовані з використанням води Milli-Q (тип I,  $\rho = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ см}$ ), отриманої за допомогою установки «Simplicity Water Purification» («Millipore», США);
- Інші неорганічні сполуки, використані в роботі, були вітчизняного виробництва зі ступенем чистоти «х.ч.».

## 2.2. Використані в роботі типи перетворювачів

У роботі використовувались золоті пластинки площею  $0.19 \text{ см}^2$  створені в Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), CNRS Тулуза. Пластинки були виготовлені шляхом вакуумного напилення шару золота товщиною 300 нм на 30 нм адгезійний шар титану нанесений на кремнієву підкладку.

Також був застосований чип ППР, він являє собою плоскопаралельну пластинку виготовлену з того ж скла, що і призма. На поверхню скла вакуумним напиленням наносять нанометровий шар хрому для покращення адгезії, а на нього 50-нм шар золота. Імерсійна рідина, яка має той же коефіцієнт заломлення світла, що і скло призми та пластини, забезпечує оптичну однорідність контакту між призмою та пластинкою з шаром золота, і запобігає розсіянню променю на їх межі.

## 2.3. Метод імпеданс-спектроскопічного дослідження для аналізу роботи ДНК-біосенсора

Експеримент по дослідженню ДНК-біосенсора виконували прикладаючи змінну напругу 10 мВ, в діапазоні частот 0,1 – 100 000 Гц при температурі 22 °С. Золоту пластинку (робочий електрод) розташовували на нижній частині комірки, зверху ставили центральну частину, в спеціальному заглибленні якої знаходиться гумове кільце, що забезпечує герметичність з'єднання, і закріплювали робочий електрод між двома частинами вимірювальної комірки за допомогою двох гвинтів (рис. 2.1). Площа активної частини електрода складає приблизно  $40 \text{ мм}^2$ . Посередині центральної частини розташована циліндрична порожнина для розчину, до верхнього краю якої щільно прилягає кришка. Ця кришка має вбудований допоміжний електрод (платиновий дріт діаметром  $\sim 0,5 \text{ мм}$ ) і отвір, в якому за



допомогою іншого гумового кільця щільно фіксували референтний хлорсрібний електрод.

Для вимірювань імпедансу необхідні по меншій мірі два електроди - робочий електрод та допоміжний електрод для забезпечення замкненого електричного ланцюга, але, як правило, використовують 3-електродну схему. Третій електрод з постійним потенціалом, наприклад, хлорсрібний, є електродом порівняння, за допомогою якого встановлюють бажану, чітко визначену напругу між робочим електродом і розчином [62].

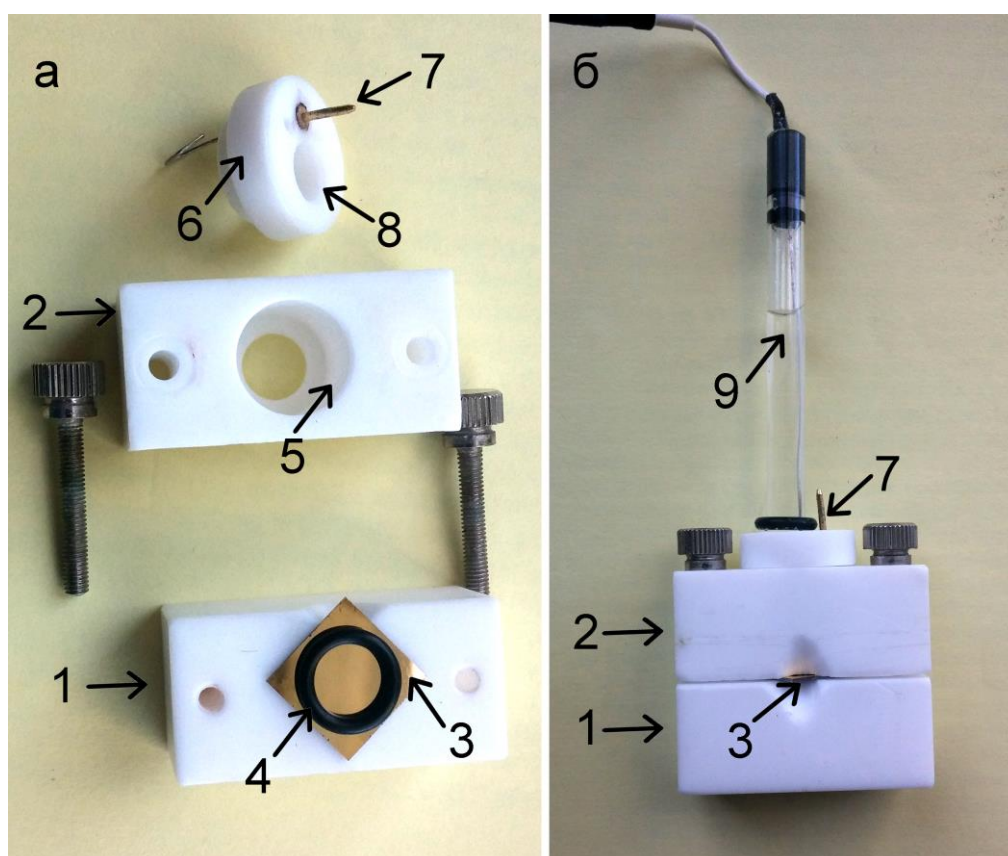


Рис. 2.1. Компоненти вимірювальної комірки (а) та зібрана комірка (б) для електрохімічних досліджень. 1 – нижня частина комірки; 2 – центральна частина комірки; 3 – робочий електрод; 4 – гумова прокладка; 5 – циліндрична порожнина для розчину; 6 – кришка; 7 – вбудований допоміжний електрод; 8 – отвір для референтного електроду; 9 – хлор-срібний електрод

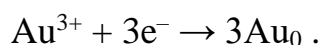
Прямо перед вимірюванням робочий електрод промивали в ультразвуковій бані впродовж 10 хвилин при 45 °С спочатку етанолом, а після – Milli-Q водою. Наступним кроком очищення електрода була обробка свіжим розчином «піранья» (суміш трьох об'ємів концентрованої H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> та одного об'єму 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) протягом 10 хвилин, після чого його поверхня була ретельно промита Milli-Q водою.

#### 2.4. Створення біоселективного шару геносенсора

Імобілізацію одноланцюгових олігонуклеотидів на поверхні очищеного робочого електрода проводили інкубацією їх 1 мкМ розчину в 0,5 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, рН 4) протягом однієї години. Для пасивації поверхні електрода (для запобігання неспецифічній сорбції) використовували 200 мкМ МКГ в 0,5 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, рН 4. Після завершення формування біоселективного шару поверхню сенсора обробляли 8 М сечовиною протягом 3 хвилин, з подальшим п'ятикратним промиванням гібридизаційним буферним розчином, для видалення не іммобілізованих ДНК-проб. При регенерації біоселективного шару використовували 8 М сечовину, після чого здійснювали п'ятикратну промивку комірки буферним розчином для гібридизації.

#### 2.5. Синтез наночастинок золота

Найпростішим і поширеним методом приготування НЧЗ є відновлення золота з окисненого стану у складі тетрахлораурат-іонів (AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>) цитратом натрію у водних розчинах при кипінні [76]:



Для приготування вихідних розчинів 6,8 мг HAuCl<sub>4</sub> розчиняють в 20 мл деіонізованої води Milli Q (1 мМ HAuCl<sub>4</sub> ) і 0,1 г Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 2H<sub>2</sub>O в 10 мл

дистильованої води (1%-ний цитрат натрію). Спочатку при постійному перемішуванні нагрівають з оберненим холодильником 20 мл 1 мМ  $\text{HAuCl}_4$  до кипіння. Додають до нього 2 мл 1%-го цитрату натрію. Впродовж 10 хвилин продовжують нагрів і перемішування. Поступово іони золота відновлюються і колір розчину стає насичено-червоним. Після цього розчин охолоджують до кімнатної температури. За допомогою такого методу отримують монодисперсні сферичні НЧЗ діаметром 10-20 нм, що завдяки слабко зв'язаному покриттю з цитрат-іонів мають негативний поверхневий заряд і характеризуються плазмонною смугою поглинання при  $\sim 520$  нм [77,78]. При умові, що всі іони золота були хімічно відновлені і увійшли до складу наночастинок, середній діаметр яких дорівнював 13 нм, концентрація отриманого препарату НЧЗ складає 13 нМ.

## **2.6. Метод контролю поверхневої густини ДНК-мішеней на поверхні наночастинок золота та приготування розчинів модифікованих НЧЗ**

Щоб визначити поверхневу густину олігонуклеотидів-проб на поверхні наночастинок золота було використано тіольовані послідовності проб *P2* з флуорофором  $\text{Cu}_3$  ковалентно пришитим на 3' кінці. На жаль, наночастинки золота ефективно гасять флуоресценцію *P2-Cu<sub>3</sub>*, тому виявилось необхідним оцінювати поверхневу густину ДНК непрямым способом. Він полягає в розділенні неіммобілізованих залишків *P2-Cu<sub>3</sub>* та наночастинок золота. Оцінивши концентрацію неіммобілізованих *P2-Cu<sub>3</sub>* та початкового розчину, можна розрахувати середню кількість проб на поверхні наночастинок. Розділення НЧЗ та неіммобілізованих *P2-Cu<sub>3</sub>* було реалізоване шляхом центрифугування, після завершення періоду інкубації воно було реалізовано при 12000 об/хв впродовж 30

хв. Після цього було відібрано супернатант, і за допомогою спектрофлуориметра було визначено рівень його флуоресценції. Концентрації ДНК в вихідному розчині та супернатанті були визначені співставленням флуоресценції зразків та стандартних розчинів різної концентрації. В силу лінійності залежності флуоресценції від концентрації частка іммобілізованих ДНК проб  $\eta = 100\% \cdot (F_{\text{вих}} - F_{\text{супернат}}) / F_{\text{вих}}$ .

Для модифікації олігонуклеотидами поверхні наночастинок проводили інкубацію в водному розчині 5 нМ НЧЗ та 200 нМ тіольованих олігонуклеотидів впродовж 12 годин. Для цього було необхідно до 208 мкл MilliQ води додати 135 мкл 13 нМ НЧЗ та 7 мкл 10 мкМ розчину тіольованих олігонуклеотидів. В будь-якому буферному розчині іммобілізація ДНК проходить відчутно краще, але при подальшому центрифугуванні агрегація НЧЗ буде суттєво залежати від іонної сили середовища. В випадку водного середовища центрифугування НЧЗ модифікованих олігонуклеотидами вона буде найменша.

Після завершення 12 годинного періоду інкубації необхідно видалити неіммобілізовані олігонуклеотиди з розчину наночастинок. За допомогою центрифугування проводили розділення неіммобілізованих олігонуклеотидів і осаду модифікованих НЧЗ.

Після концентрування 350 мкл розчину 5 нМ наночастинок до 30 мкл розчину він був розведений MilliQ водою до 100 мкл. Аналіз кількості наночастинок в цьому розчині був проведений за допомогою аналізу спектрів поглинання спектрофотометром «Nanodrop2000» в об'ємі 2 мкл. Концентрація НЧЗ пропорційна екстинкції, тому, вимірявши відповідні спектри для отриманого концентрату та початкового 5 нМ розчину, можна розрахувати концентрацію наночастинок та оцінити втрати на етапі відбору супернатанту. В результаті отримували водний

розчин модифікованих наночастинок відомої концентрації для подальших досліджень.

## 2.7. Використання методу поверхневого плазмонного резонансу

Щоб розпочати роботу з спектрометром ППР «Плазмон 6» (рис. 2.2), необхідно підготувати чип ППР. Для цього його поверхня промивається Milli-Q водою та сушиться під струменем азоту. Після чого чип занурюють в щойно приготований розчин «піраньї» (суміш 3:1 концентрованої  $H_2SO_4$  та 30%  $H_2O_2$ ) на 2 хв при кімнатній температурі. А потім чип багаторазово промивається Milli-Q водою.

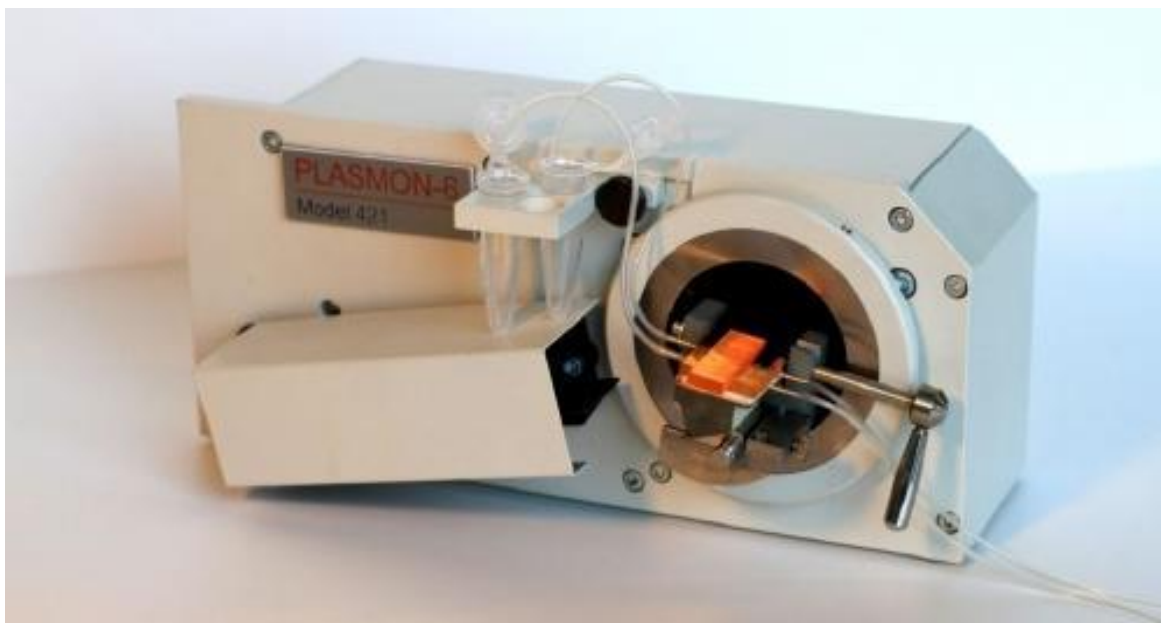


Рис. 2.2. Зовнішній вигляд спектрометра ППР «Плазмон-6» на базі конфігурації Отто-Кречмана

Оброблену пластинку встановлювали на призму приладу, використовуючи імерсійну рідину, що має такий же показник заломлення світла, як і скло призми та

пластинки. Таким чином, для поширення світла ці три елементи являють собою єдине ціле. Золота поверхня слугувала дном проточної вимірювальної комірки об'ємом приблизно 20 мкл. Кільце з силіконової гуми створювало її стінки. Кришка з оргскла містила в собі отвори для з'єднання з вхідною та вихідною трубками, по яким через комірку проходять буферний розчин та дослідні зразки. Швидкість потоку рідини (в основному 40 мкл/хв.) контролювали за допомогою перистальтичного насоса. Досліджуваний розчин подається у вимірювальну комірку спектрометра «Плазмон 6» по полімерних трубоках за допомогою перистальтичного насоса «Ismatec». Даний прилад може вимірювати ППР криву з кроком, починаючи з 10 сек, і будувати відповідну сенсограму, що відслідковуватиме стан сенсорної поверхні.

## **2.8. Розробка і використання програм для оптимізації процесу вимірювань**

Однією з найбільш поширених операцій в роботі з інформацією є конвертування форматів файлів при аналізі даних. Під час виконання роботи було написано ряд програм для полегшення аналізу файлів приладів «Voltalab», «Nanodrop 2000», «Плазмон 6», «Unico», візуалізації та інтерпретації даних отриманих за їхньою допомогою.

Прилад поверхневого плазмонного резонансу чутливий до багатьох випадкових факторів. Ці фактори можуть впливати на відгук ППР як швидко і непрогнозовано, так і повільно та передбачувано. В другому випадку вони породжують дрейф базової лінії, який можна врахувати. Розроблена програма забезпечує вибір оператором кривої для наближення лінії тренду дрейфу, дозволяє відкоригувати його вплив (рис. 2.3).

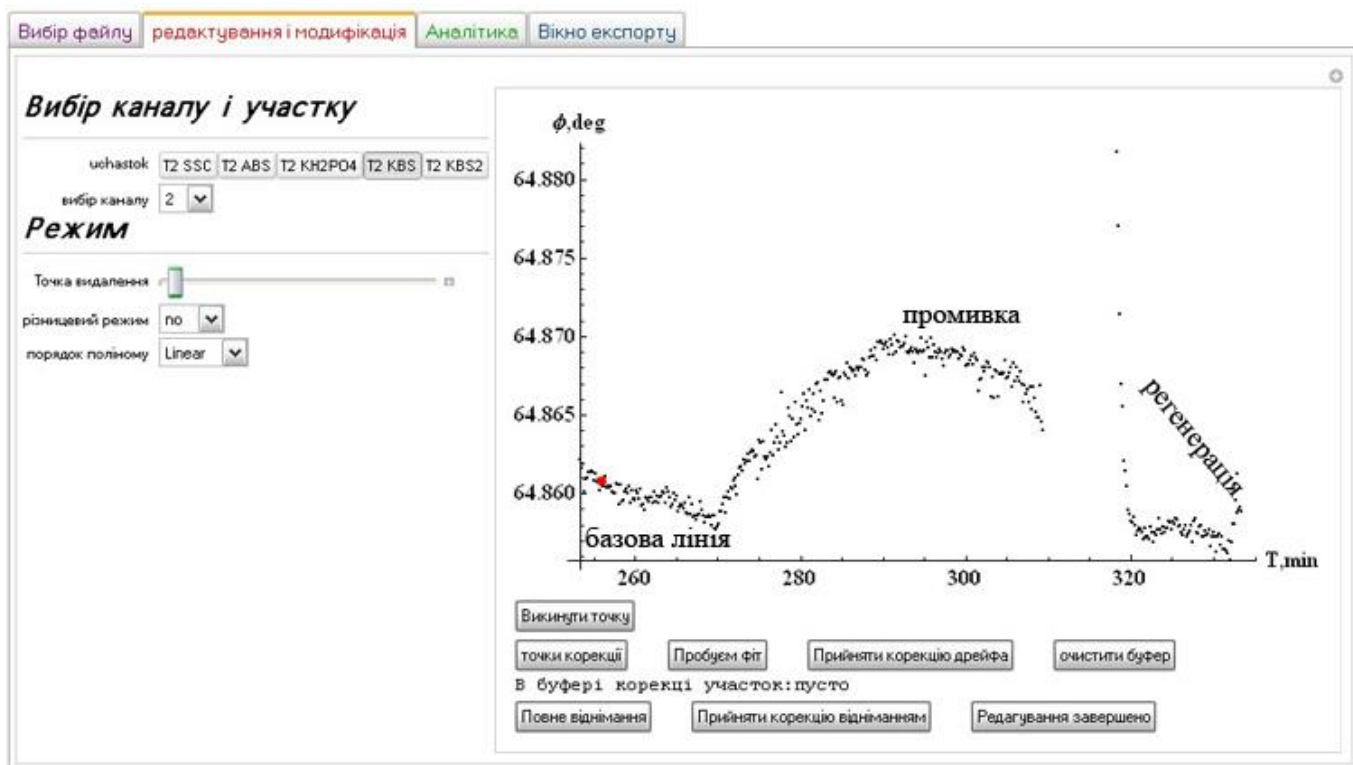


Рис. 2.3. Вікно інтерфейсу програми для корекції дрейфу

Метод ППР дозволяє відслідкувати динаміку макромолекулярної взаємодії в реальному часі. Щоб скористатися цією перевагою необхідно неодмінно мати метод інтерпретації отриманих результатів. В роботі було проаналізовано модель Ленгмюра і підбрано декілька типів кривих для наближення даних гібридизації. Реалізовано зручний інтерфейс, що дозволяє швидко наближувати криві асоціації і дисоціації, отримувати їх рівняння та кореляцію з даними вимірювань. Приклад інтерфейсу та конкретного наближення даних наведено на рис. 2.4.

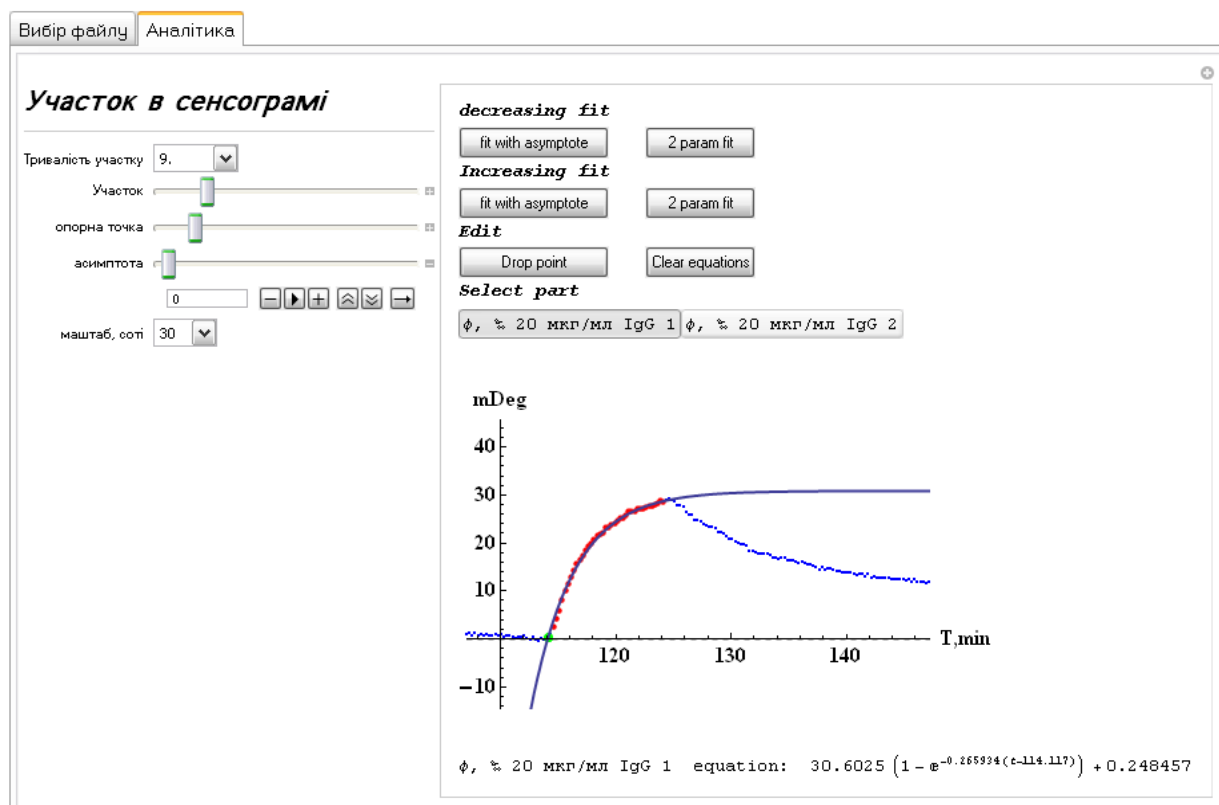


Рис. 2.4. Програма для аналізу кінетики кривих гібридизації ППР

Програма для аналізу спектрів NanoDrop 2000 була розроблена для швидкого пошуку вершин спектрів екстинкції одного зразку, їх усереднення та врахування шуму при вимірюванні. Головною метою написання цієї програми є швидка обробка десятків спектрів екстинкції за одиниці хвилин, що дозволило швидко і надійно оцінювати концентрацію наночастинок і відслідковувати зміни в їх спектрі. Приклад інтерфейсу програми та поліномного наближення вершини спектрів екстинкції програми для аналізу спектрів NanoDrop 2000 наведено на рис. 2.5.



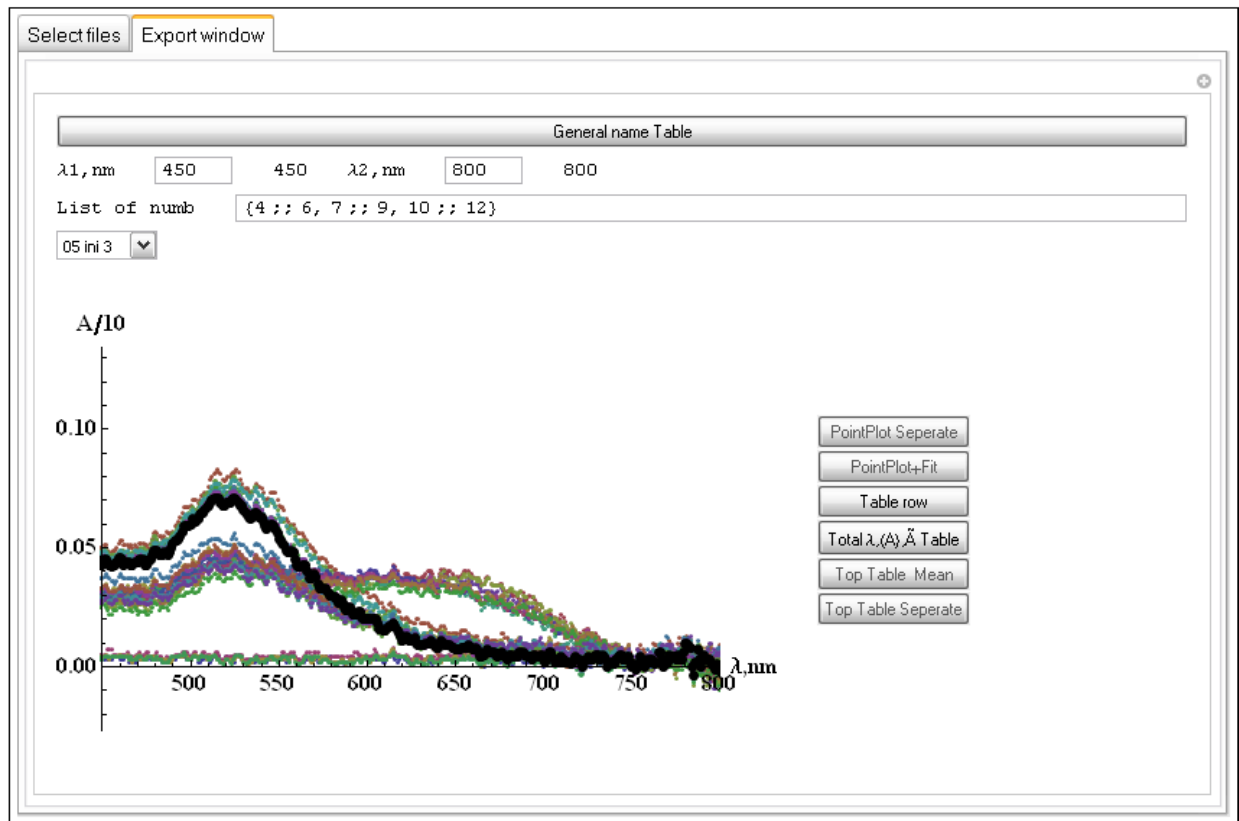


Рис. 2.5. Програма для швидкого аналізу спектрів екстинкції Nanodrop 2000:

Обробка спектрів імпедансної спектроскопії досить затяжний і трудомісткий процес. Кожен спектр імпедансу заноситься у файл-таблицю, яку обов'язково необхідно проінтерпретувати. Зазвичай дослідження будь-чого за допомогою ЕІС включає в себе вимірювання по меншій мірі сотні таких кривих. Тому написання програми для їх аналізу було необхідністю. Програма виконує наступні функції:

- дозволяє майже миттєво переглянути спектри імпедансу досліджуваного розчину;
- допомагає швидко конвертувати дані в OriginLab;
- дозволяє виокремити дані, що відповідають одній окремій частоті і експортувати їх.

Приклад інтерфейсу програми наведено на рис. 2.6. Вона забезпечує первинний аналіз спектрів імпедансу для інтерпретації результатів експерименту.

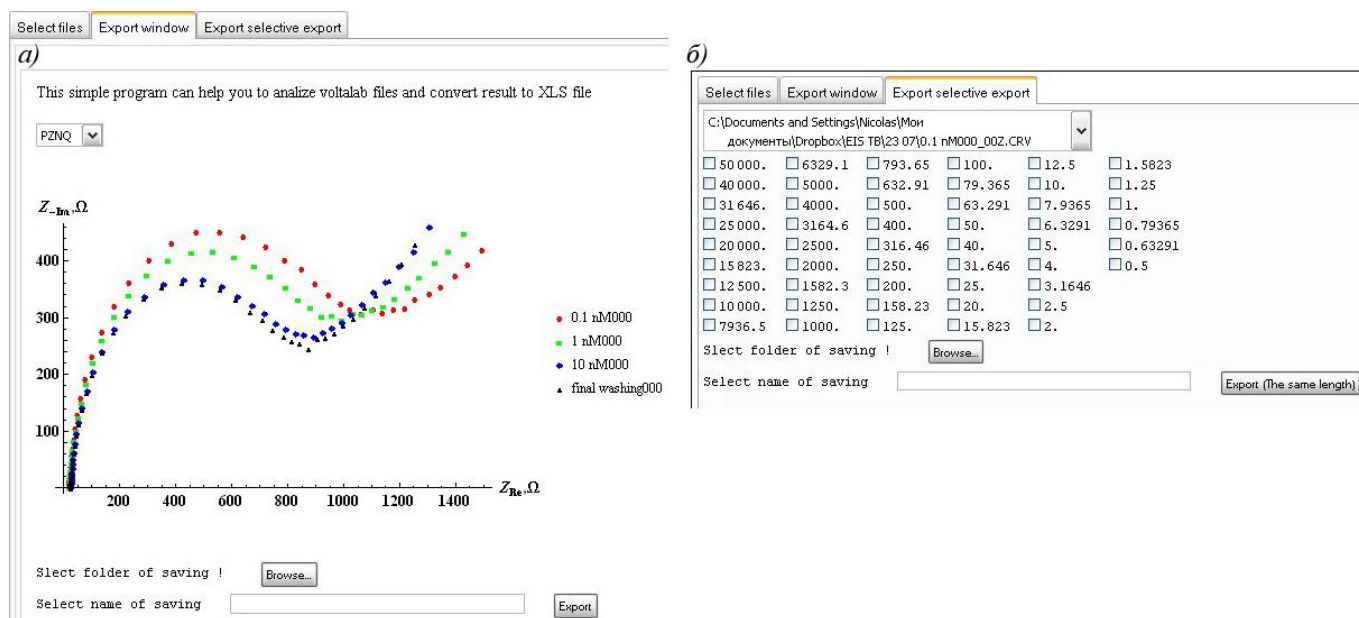


Рис. 2.6. Програма для візуалізації і аналізу спектрів імпедансної спектроскопії: попередній огляд спектрів та основне меню експорту даних (а), меню детального аналізу спектрів імпедансу та аналізу поведінки імпедансу на фіксованих частотах (б)

Крім того, в роботі було використано комерційну програму ZFit для детального аналізу спектрів імпедансу і визначення характеристик його елементів. Вона реалізує багатопараметричну задачу наближення даних спектрів імпедансу модельними еквівалентними схемами. Саме з її допомогою було отримано всі характерні значення величин елементів схеми Рендлеса та інших еквівалентних схем.

## РОЗДІЛ 3

### РОЗРОБКА ІМПЕДИОМЕТРИЧНОГО ГЕНОСЕНСОРА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ МУТАЦІЙ В ГЕНІ *rpoB M. TUBERCULOSIS*

#### 3.1. Вибір нуклеотидної послідовності та довжини фрагмента гена *rpoB M. tuberculosis* для використання як проби при іммобілізації на сенсорній поверхні

Щоб забезпечити надійне розпізнавання ДНК послідовності, важливо правильно вибрати пару проба-мішень. Послідовність олігонуклеотида-проби повинна бути не тільки унікальною і придатною для селективної взаємодії з досліджуваними зразками, але й відповідати ряду вимог, що дозволять її ефективно використати. Важливими питаннями при виборі послідовності є її унікальність (майже будь-яка послідовність більше 18 ланок є унікальною), довжина (впливає на селективність розпізнавання і енергію взаємодії в системі мішень/проба), послідовність основ, від якої поміж іншого залежить здатність до формування внутрішньо-молекулярних вторинних структур (самогібридизація), GC-склад визначає енергію взаємодії і температуру плавлення подвійної спіралі (оптимальною можна вважати частку GC пар в діапазоні 40-60%).

Тому з досліджуваного гена повинна бути вибрана послідовність ДНК за допомогою розрахункового веб сервісу, наприклад, в цьому дослідженні було використано сервіс Mfold, що дозволяє підбирати оптимальну пробу шляхом перебору по ряду параметрів [79]. В нашому випадку необхідно вибрати пробу з дуже обмеженого фрагмента ДНК, що містить кодон 531 TCG→TTG гена *rpoB M.*

*tuberculosis*. Це найбільш часта мутація, що викликає стійкість до препарату рифампіцину, що належить до протитуберкульозних препаратів першої лінії [36,80].

Послідовності проб були досліджені за наступними параметрами:

- Довжина послідовності проби досліджувалась в діапазоні 18–30 нуклеотидів (довжина достатня аби забезпечити унікальність послідовності);
- Бажано, щоб вміст GC пар в послідовності був в межах від 40-60% (для забезпечення оптимальної енергії зв'язування ДНК з комплементарною послідовністю);
- Самогібридизацію проби необхідно мінімізувати за рахунок правильного вибору послідовності проби (щоб запобігти виникненню сильних внутрішньомолекулярних взаємодій, здатних конкурувати з міжмолекулярними взаємодіями).

Використання проб довжиною від 18 до 30 нуклеотидів є типовим при розробці біосенсорів. Це пояснюється тим, що при цих довжинах можливо одночасно досягти виконання декількох важливих вимог до проби як селективного елемента. Ключовою вимогою є унікальність послідовності ДНК-проби для селективного розпізнання ДНК-мішені. Вона забезпечується складом і довжиною послідовності, якщо вважати 18-ти членну послідовність цілком випадковою, то з імовірністю  $p=4^{-18} \approx 1,45 \cdot 10^{-11}$  існує випадкова ДНК послідовність повністю комплементарна пробі. Враховуючи, що всього в геномі людини  $3,1 \times 10^9$  пар основ, то такий підхід може забезпечити унікальність ДНК проби не тільки на рівні гена або хромосоми, а і на рівні геному. Верхня границя діапазону довжини проби визначається більш умовно. Вона вибирається так, щоб енергія гібридизації була більшою у порівнянні з енергією самогібридизації проби та ДНК-мішені. Крім того, короткі ДНК-проби є більш чутливими до заміни в послідовності ДНК-мішені, що збільшує актуальність їх використання для селективної гібридизації.

Щоб охарактеризувати рівень внутрішньомолекулярних та міжмолекулярних взаємодій потенційних проб, був використаний веб сервер DINAMelt [81]. Спочатку були отримані значення термодинамічних параметрів, пов'язаних з самогібридизацією різних послідовностей проби, що містили кодон 531. Було показано, що олігонуклеотиди, які містять 18–21 основи не можуть формувати міцні внутрішньомолекулярні зв'язки (наприклад в  $2\times\text{SSC}$  при  $22^\circ\text{C}$ ,  $\Delta G = -0,39$  ккал моль<sup>-1</sup>). В той час як олігонуклеотиди, що містять 22–30 основ демонструють поступове збільшення параметрів самогібридизації ( $\Delta G$  зростає від  $-1,02$  до  $-8,92$  ккал моль<sup>-1</sup>). Дуже високий GC вміст (більше 85%) послідовності гена праворуч (з 3' кінця) від кодону 531 визначив наш вибір 21-основної послідовності з цим кодоном на 3'-кінці. Вибраний фрагмент має рівень GC складу 61.9% (близько до оптимуму 40-60%). Для подальших пошуків можливості виявлення та дискримінації олігонуклеотидів, що відрізняються лише за одним нуклеотидом, було необхідно посилити різницю між ними. В своїй роботі Hughes et al. [82] показали, що ДНК проба більш чутлива до неспівпадіння послідовності з вільного кінця, ніж з іммобілізованого. Тому бажано, щоб позиція заміни в ДНК-мішені відповідала фрагменту послідовності проби, який є якомога ближче до вільного кінця проби. Порівняння змін енергії гібридизації для різних положень заміни показало, що  $\Delta G^{\text{compl}} - \Delta G^{\text{mism}}$  варіювалось в діапазоні  $-2,5$  ккал моль<sup>-1</sup> при заміні в позиціях 17–20, а в позиції 21 зміна енергії гібридизації  $\Delta G^{\text{compl}} - \Delta G^{\text{mism}}$  набувала значення всього  $-0,6$  ккал моль<sup>-1</sup>. Саме тому олігонуклеотид з заміною в 20 позиції ACC SAC AAG CGC CGA CTG TTG був вибраний як ДНК проба P2.

Для проведення іммобілізації на золотій поверхні 5'-кінець олігонуклеотида був модифікований SH групою та спейсером з 6 метиленових груп. Цей спейсер потрібен, щоб зменшити стеричні перешкоди при гібридизації поблизу сенсорної поверхні. Для забезпечення селективності розпізнавання використовували

послідовності: *T2* (CAA CAG TCG GCG CTT GTG GGT) – повністю комплементарну до проби, вона містить мутацію в 531 кодоні послідовності гена *proB*, *TN* (CGA CAG TCG GCG CTT GTGGGT), послідовність нормального гена (частково комплементарна до проби *P2*), та некомплементарного олігонуклеотида *TC* (GCT ATC AGC CAC GAA CAC CCA).

Від ефективності іммобілізації одноланцюгових олігонуклеотидів-проб в значній мірі залежить уся подальша робота гібридизаційного ДНК-біосенсора. Процес іммобілізації має привести до надійної фіксації олігонуклеотида на робочій поверхні та забезпечити доступність проби для її взаємодії з комплементарними фрагментами нуклеїнових кислот досліджуваних зразків. Зміни кута плазмонного резонансу впродовж іммобілізації можна конвертувати в поверхневу густину іммобілізованої речовини, використовуючи емпірично отримане співвідношення відповідності відгуку в 120 мград поверхневій щільності ДНК в 100 нг см<sup>-2</sup> [83, 84]. З його допомогою можна оцінити кількість молекул ДНК зв'язаних з сенсорною поверхнею. Для іммобілізації тіольованих олігонуклеотидів на поверхні золота часто використовують умови запропоновані Herne & Tarlov [85]: розчин 1,0 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> (рН 3,8) та час інкубації 120 хв. Вважається, що при низькій величині рН та високій іонній силі електростатичне відштовхування негативно заряджених ланцюгів ДНК мінімізується. Це створює сприятливі умови для високої щільності іммобілізації тіольованих олігонуклеотидів на поверхні золота.

З іншого боку, занадто висока щільність іммобілізованих олігонуклеотидів може спричинити зниження швидкості та ефективності наступного процесу гібридизації комплементарних фрагментів нуклеїнових кислот [86]. Тому, щоб запобігти занадто високій поверхневій щільності, зазвичай, іммобілізацію 1 мкМ тіольованого олігонуклеотиду *P2* проводили у двічі менш концентрованому

буферному розчині 0,5 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (рН 3,8), впродовж 60 хв. при кімнатній температурі.

Тіольовані олігонуклеотиди взаємодіють з поверхнею золота своїми SH-групами. При цьому формуються сульфідні комплекси золота і олігонуклеотиди надійно фіксуються на поверхні. Але не виключаються і фізичні взаємодії олігонуклеотида, наприклад між тимідинами та поверхнею золота [87], що можуть створити перешкоди для наступної гібридизації. Щоб зменшити ймовірність таких процесів, проводять пасивацію поверхні, тобто блокування тих місць на поверхні золота, які залишилися вільними від тіольованих груп олігонуклеотидів. Для пасивації поверхні використовували розчини відносно коротких тіолів 6-меркапто-1-гексанолу (МКГ). Обробку сенсорної поверхні 1 мМ розчином МКГ у воді протягом 10 хв після стадії іммобілізації односторонньо тіольованих олігонуклеотидів було використано для остаточного формування біоселективного елемента ППР.

Відповідно до вище наведеної техніки, було створено гібридизаційний ДНК біосенсор. Він розпізнає олігонуклеотиди шляхом їх селективної гібридизації з іммобілізованими пробами. Оскільки селективність являється критичним параметром для геносенсора, то для її забезпечення було зроблено певні кроки шляхом підбору жорсткості умов гібридизації. Умови гібридизації не однаково впливають на енергію взаємодії проби з повністю та частково комплементарною ДНК, вони можуть бути використані для покращення розпізнання ДНК-мішені. Для прогнозування відгуку біосенсора було розраховано енергію взаємодії в різних буферних розчинах (починаючи з  $0,06 \times \text{SSC}$  до  $6 \times \text{SSC}$ ) для пар олігонуклеотидів  $P2$  і  $T2$ ,  $P2$  і  $TN$ ,  $P2$  і  $TC$  (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Розрахункові значення вільної енергії Гіббса взаємодії пар олігонуклеотидів, пов'язаних з геном *rpoB M. tuberculosis*. Всі розрахунки були виконані для таких умов: 22 °С, 100 нМ кожного з олігонуклеотидів**

Пари нуклеотидів	$\Delta G$ (ккал/моль)						
	0,06×SSC	0,1×SSC	0,5×SSC	1×SSC	2×SSC	4×SSC	6×SSC
<i>P2 i T2</i>	-26,7	-27,8	-31,3	-32,7	-34,2	-35,8	-36,6
<i>P2 i TN</i>	-24,8	-25,8	-29,0	-30,4	-31,9	-33,3	-34,1
<i>P2 i TC</i>	-3,1	-3,3	-3,8	-4,0	-4,3	-4,9	-5,2

З таблиці видно, що частка  $(\Delta G^{\text{compl}} - \Delta G^{\text{mism}}) / \Delta G^{\text{compl}}$  залежить від іонної сили розчину. Враховуючи, що дані розрахунки були проведені для буферного розчину, а не для гетерогенної системи, вони не враховують ряд стеричних обмежень та сильніше відштовхування олігонуклеотидів між собою. Врахування цих дестабілізуючих факторів приведе до посилення різниці відгуку біосенсора на різні ДНК-мішені.

### **3.2. Розробка імпедиметричного ДНК біосенсора для виявлення мутацій в гені *rpoB M. tuberculosis***

Чутливість електрохімічної імпедансної спектроскопії дозволяє реєструвати навіть відносно незначні зміни в приповерхневому переносі електричних зарядів. Перенос заряду у системі, пов'язаний з фарадеївськими процесами поблизу поверхні робочого електрода, визначається окисно-відновною реакцією за участю гексаціанофератів. Ефективність цієї реакції залежить від абсолютного значення та стабільності (контрольованості) прикладеного потенціалу. Як видно з рис. 3.1, середина петлі гістерезису реакції  $E_{1/2}$  відповідає потенціалу 0,24 В (він знаходиться



між піками окислення і відновлення). При цьому значенні напруги, що відповідає стандартному потенціалу пари гексаціанофератів, вдається позбутися нерівноважного розподілу зарядів поблизу поверхні. Тому для визначення імпедансу системи даний постійний потенціал відносно хлор-срібного електрода було прикладено до робочого електрода, амплітуда змінної синусоїдальної напруги складала 10 мВ.

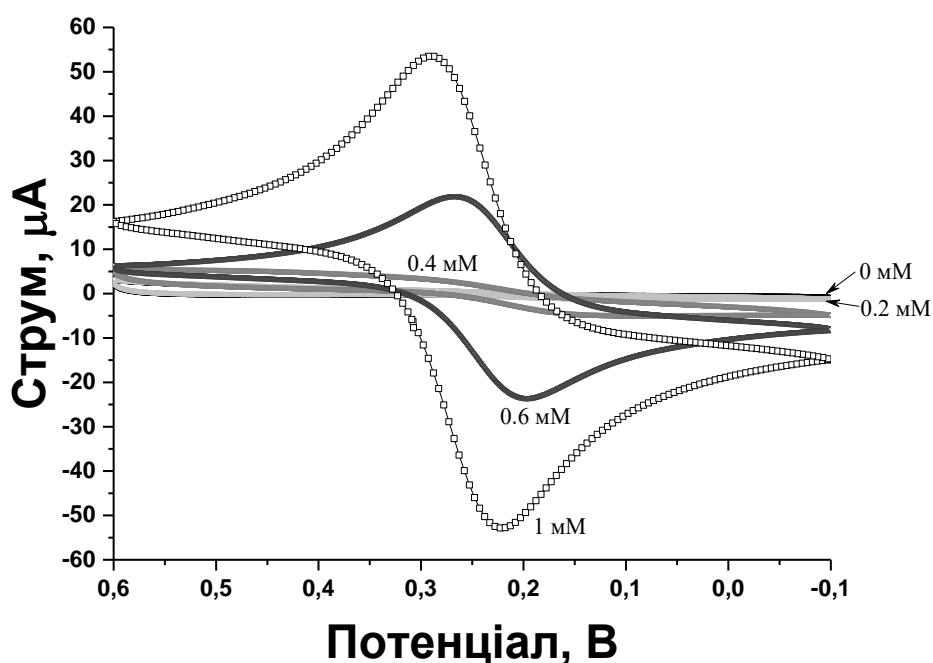


Рис. 3.1 Вольтамперограми еквімолярних розчинів гексаціанофератів калію (III та II) різних концентрацій в буферному розчині 2×SSC

Вибір оптимальної концентрації суміші гексаціанофератів було зроблено на основі того, що зі збільшенням їх концентрації росте чутливість вимірювань, але в нашій системі концентрації вищі за 1 мМ викликали відносно великий приповерхневий струм, який впродовж вимірювань приводив до деградації біоселективного шару. Тому саме суміш 1 мМ гексаціаноферату (II) калію та 1 мМ гексаціаноферату (III) калію використовували в подальших дослідженнях.

Вимірювання проводили в діапазоні частот 0,1 Гц - 100 кГц, тому, що аналітично значущі імпедансні спектри зазвичай записують на частотах, де опір переносу заряду в основному контролюється поверхневими властивостями модифікованих електродів ( $10 \text{ мГц} < f < 100 \text{ кГц}$ ) [88].

На початку експерименту було створено біоселективний шар на основі іммобілізованого олігонуклеотиду *P2* (механізм описано в розділі 2.4), декілька разів визначили базовий імпеданс, щоб впевнитись в його стабільності. Тільки після цього вводили у вимірювальну комірку розчин олігонуклеотиду *T2* і, щоб відслідкувати динаміку формування сенсорного сигналу, в процесі їх гібридизації з іммобілізованим олігонуклеотидом *P2*, визначали імпеданс через деякі проміжки часу. Як видно з рис. 3.2а, впродовж перших 20 хвилин імпеданс системи зростає, а після того його величина виходить на насичення. Це можна інтерпретувати як досягнення рівноваги процесу гібридизації. Тому даний час інкубації використовували в наступних експериментах.

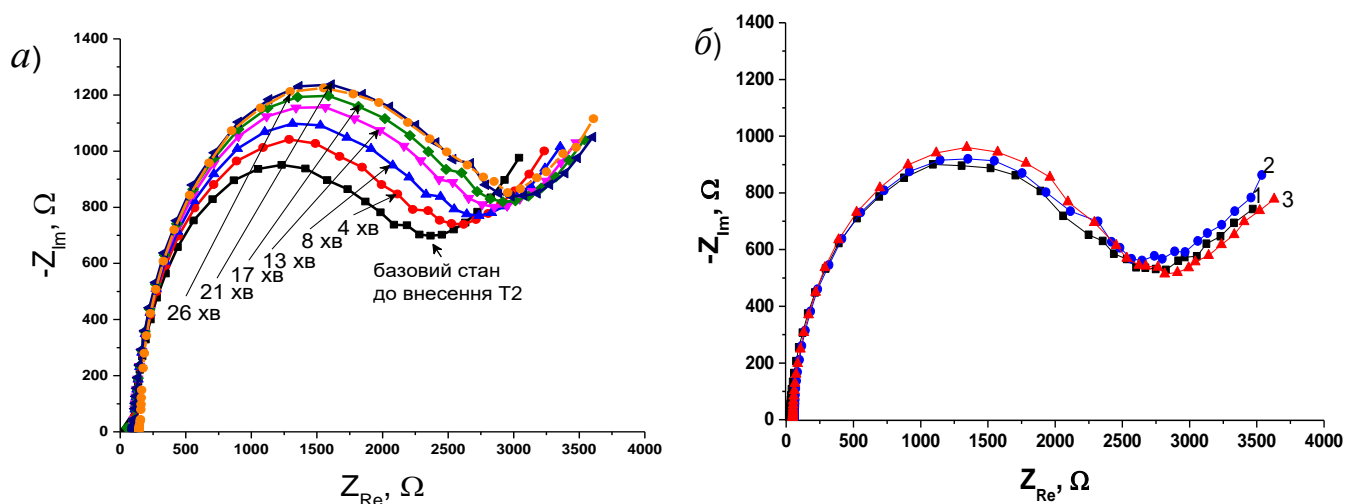


Рис. 3.2. Динаміка формування сенсорного сигналу в процесі гібридизації 1 нМ **T2** з іммобілізованими на сенсорній поверхні *P2* в  $2 \times \text{SSC}$  буферному розчині (а); відтворюваність кривої імпедансу після зазначених циклів гібридизації-регенерації (б: 1 першого циклу; 2 другого циклу; 3 третього циклу)

Проведення регенерації сенсорної поверхні за допомогою 8М розчину сечовини руйнує подвійну спіраль і, в ході подальшого промивання вимірювальної комірки, видаляє олігонуклеотиди  $T2$ , що зменшує імпеданс системи і відтворює його початкове значення. Вигляд кривої Найквіста після кожного з трьох циклів гібридизації і регенерації продемонстровано на рис. 3.8 б. Крива добре відтворюється, реальна компонента опору варіюється в межах 2 %, уявна компонента варіюється в межах 3 %. Ця відтворюваність дозволяє багатократне використання біосенсора, тому в всіх подальших експериментах було зроблено п'ятикратне повторення вимірювань і проаналізовано найбільш типові його результати.

Для опису електронно-обмінних процесів поблизу поверхні золотого робочого електрода та за для моделювання зміни поверхневого імпедансу, пов'язаної з його модифікацією, підходить класична еквівалентна схема Рендлеса (рис. 3.3).

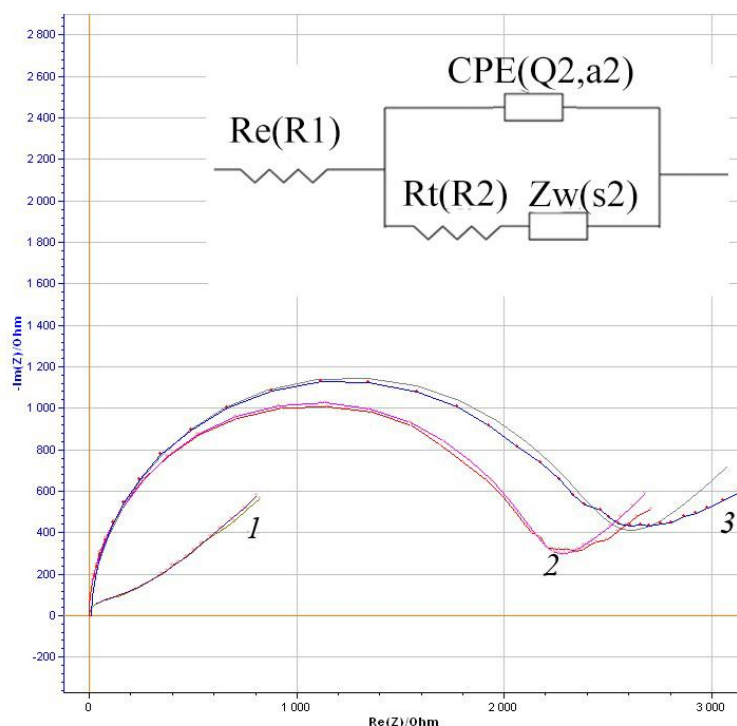


Рис. 3.3. Експериментальні дані та їх апроксимації еквівалентною схемою Рендлеса для немодифікованого електрода (1), електрода модифікованого  $P2$  і МКГ (2) та електрода після гібридизації  $P2-T2$  (3)

На рис. 3.3 показано моделювання імпедансу немодифікованого робочого електрода (крива 1), модифікованого *P2* і МКГ (крива 2) та після гібридизації 1нМ цільового олігонуклеотида *T2* з іммобілізованим *P2* (крива 3). Всі ці криві відповідають вище описаній еквівалентній схемі Рендлеса, з використанням якої вони промодельовані за допомогою програми ZFit (результати моделювання наведено в табл. 3.2). Якщо різниця між параметрами схеми, що відповідають немодифікованому електроду (1) та модифікованому *P2* і МКГ (2) є значна, то процес гібридизації відчутно збільшує опір переносу заряду ( $R_e$ ) при відносно незначному зсуві характеристик СРЕ елемента (3). Відповідно, зміну саме  $R_e$  можна співвідносити з процесом гібридизації.

Таблиця 3.2

**Характеристики елементів еквівалентної схеми Рендлеса немодифікованого електрода (1), модифікованого *P2* і *MCH* (2) та після гібридизації *P2-T2* (3)**

	1	2	3
$R_e$	$7 \pm 6 \text{ Ом}$	$7 \pm 1 \text{ Ом}$	$3 \pm 1 \text{ Ом}$
$Q_{\text{CPE}}$	$(37 \pm 4) \cdot 10^{-5} \text{ Ф} \cdot \text{с}^{a-1}$	$(2659 \pm 18) \cdot 10^{-9} \text{ Ф} \cdot \text{с}^{a-1}$	$(2954 \pm 20) \cdot 10^{-9} \text{ Ф} \cdot \text{с}^{a-1}$
$a_{\text{CPE}}$	$0,397 \pm 0,515$	$0,965 \pm 0,509$	$0,955 \pm 0,507$
$R_t$	<b><math>546 \pm 32 \text{ Ом}</math></b>	<b><math>2128 \pm 3 \text{ Ом}</math></b>	<b><math>2403 \pm 2 \text{ Ом}</math></b>
$\sigma_w$	$861 \pm 68 \text{ Ом} \cdot \text{с}^{-1/2}$	$553 \pm 1 \text{ Ом} \cdot \text{с}^{-1/2}$	$751 \pm 2 \text{ Ом} \cdot \text{с}^{-1/2}$

Для дослідження селективності отриманого біосенсора порівняли результати гібридизації на сенсорній поверхні трьох послідовностей одноланцюгових олігонуклеотидів: *T2* (повністю комплементарні), *TN* (які відрізнялися від *T2* одним нуклеотидом) і *TC* (некомплементарні) (рис. 3.4). Поверхневий опір після 20-хвилинної інкубації 50 нМ некомплементарної послідовності *TC* зростає з свого

початкового значення  $R_e^{\text{base}} = 2387 \text{ Ом} \pm 25 \text{ Ом}$  до  $R_e^{\text{TC}} = 2508 \text{ Ом} \pm 23 \text{ Ом}$ , що є значно менше відгуку на введення 1 нМ повністю комплементарних олігонуклеотидів  $T2$ :  $R_e^{T2} = 3019 \text{ Ом} \pm 37 \text{ Ом}$  (навіть при в 50 разів більшій концентрації  $TC$ ). Таким чином, за допомогою електрохімічного імпедансного гібридаційного ДНК-сенсора, вдалося селективно детектувати олігонуклеотиди, пов'язані з геном *rpoB* *M. tuberculosis*. При порівнянні отриманого результату з результатами роботи з використанням біосенсорної системи на основі поверхневого плазмонного резонансу, де мінімальна межа визначення олігонуклеотидів  $T2$  дорівнювала 10 нМ [89], слід відмітити, що за допомогою ЕІС селективне детектування було досягнуто при значно меншій концентрації цільових олігонуклеотидів.

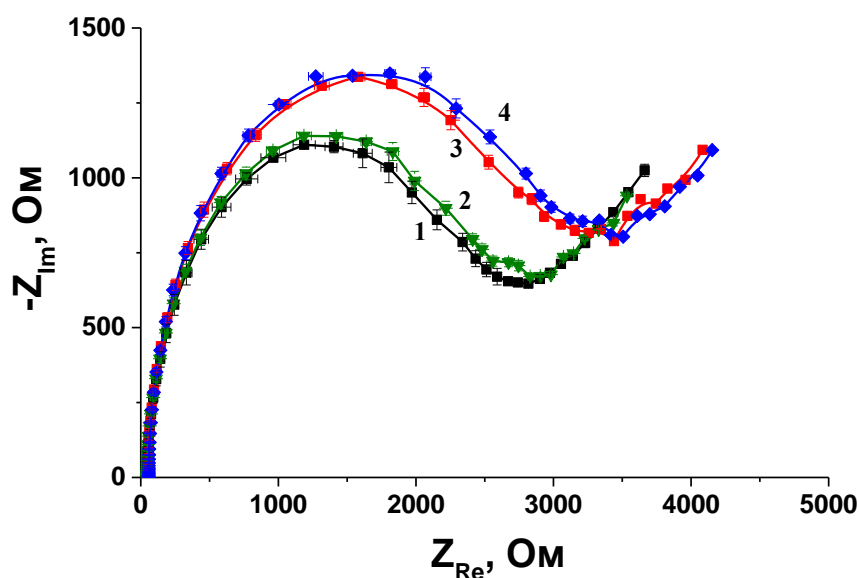


Рис. 3.4. Діаграма Найквіста, що відображає початковий імпеданс системи (1) та результати гібридації на сенсорній поверхні трьох одноланцюгових олігонуклеотидів: 50 нМ  $TC$  (2), 1 нМ  $TN$  (3), 1 нМ  $T2$  (4).

У всіх досліджених випадках найбільш відчутно поверхневий опір  $R_e$  змінюється в діапазоні частот 1-10 Гц, де імпеданс зростає по модулю при незначних змінах його фази.

Для розрізнення повністю комплементарних олігонуклеотидів  $T2$  від частково комплементарних  $TN$  було запропоновано зменшити кратність буферного розчину для гібридизації. Як відомо, висока концентрація катіонів, наприклад, іонів натрію, які компенсують електростатичне відштовхування негативно заряджених фосфатних груп ДНК, справляють стабілізуючий вплив на подвійну спіраль. І навпаки, зменшення іонної сили буфера буде ослаблювати структуру ДНК, водночас цей вплив буде різним на повністю комплементарні та частково комплементарні комплекси. Рис. 3.5 демонструє, що використання розчину  $0,5 \times SSC$  дійсно привело до відчутного покращення селективності біосенсора. Якщо введення у вимірювальну комірку  $1 \text{ нМ } T2$  викликає зміни поверхневого опору на сотні Ом ( $R_e^{\text{base}} = 5274 \text{ Ом} \pm 41 \text{ Ом}$ , а  $R_e^{T2} = 5686 \text{ Ом} \pm 43 \text{ Ом}$ ), то зміни поверхневого опору при введенні  $1 \text{ нМ } TN$  ( $R_e^{TN} = 5319 \text{ Ом} \pm 47 \text{ Ом}$ ) практично не відрізняються від похибки вимірювань. Такий показник як співвідношення зміни сенсорного сигналу, отриманого при гібридизації  $P2-T2$ , до зміни сенсорного сигналу, отриманого при гібридизації  $P2-TN$  у  $2 \times SSC$  буферному розчині, складав  $632 \text{ Ом} / 508 \text{ Ом} \approx 1,2$ , а у  $0,5 \times SSC$  – сягнув величини  $412 \text{ Ом} / 45 \text{ Ом} \approx 9,2$ . Тобто, було досягнуто суттєвого рівня розрізнення олігонуклеотидів, один з яких представляє собою фрагмент гена *rpoB* *M. tuberculosis*, що відтворює мутацію, яка призводить до стійкості мікобактерій до рифампіцину, а другий – фрагмент нормального, немутованого гена і відрізняється від першого однією однонуклеотидною заміною.

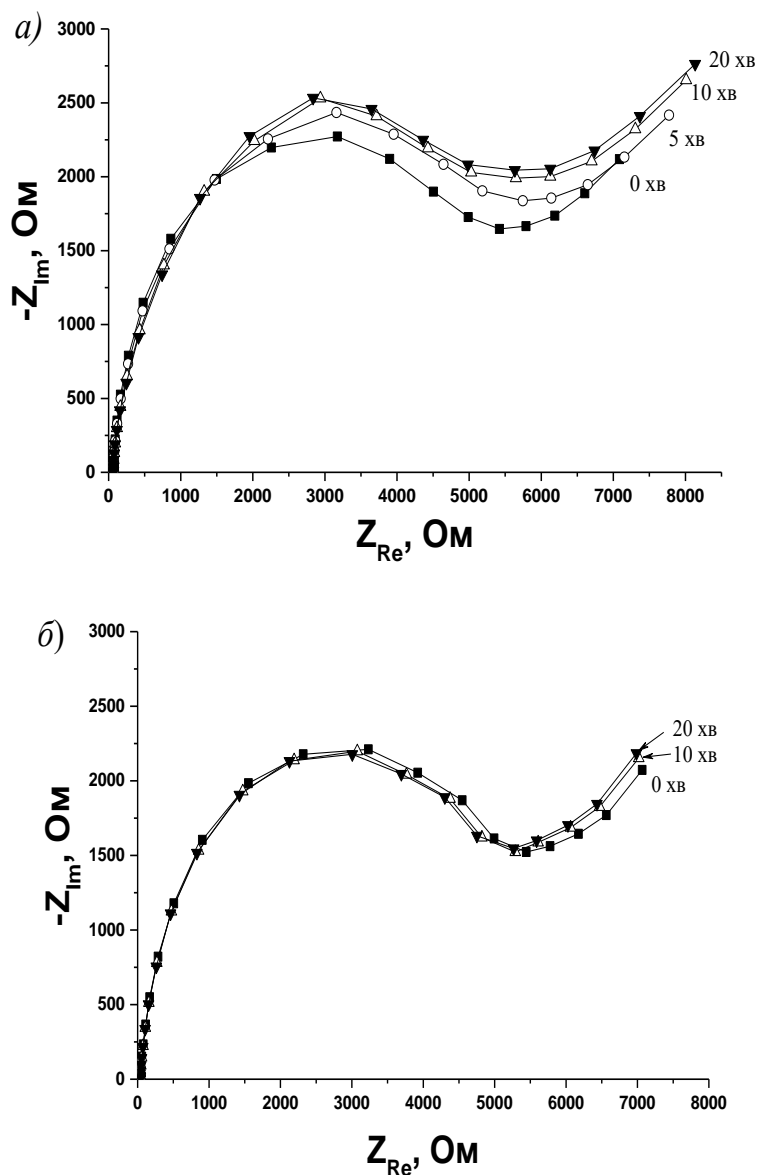


Рис. 3.5. Динаміка формування сенсорного сигналу в процесі гібридизації олігонуклеотидів *T2* (а) та *TN* (б) з іммобілізованими на сенсорній поверхні *P2* в  $0,5 \times \text{SSC}$  буферному розчині

Таким чином, вперше за допомогою розробленого електрохімічного імпедансного гібридизаційного ДНК-сенсора з використанням трьохелектродної схеми вимірювань та пари окисно-відновних маркерів гексаціанофератів (II/III), вдалось з високою селективністю детектувати мутації в гені *rpoB* *M. tuberculosis*, при їх 1 нМ концентрації. Крім того, шляхом зміни іонної сили буфера для

гібридизації було досягнуто високого рівня розрізнення двох олігонуклеотидів, що відрізняються лише однією однонуклеотидною заміною.

### 3.3. Висновки

Підсумовуючи дані наведені в розділі, зауважимо що в роботі було в перше створено електрохімічний (імпедіометричний) ДНК-сенсор для визначення мутацій в гені *rpoB M. tuberculosis*. Геносенсор був здатний детектувати послідовності ДНК, в наномолярних концентраціях, без використання молекулярних міток. Він був реалізований на базі простої, гнучкої технології планарних кондуктометричних перетворювачів. Вона здатна забезпечувати серійне виробництво, компактизацію та мініатюризацію майбутніх біосенсорів.

Дослідження оптимальної нуклеотидної послідовності та довжини для використання як проби при іммобілізації на сенсорній поверхні для селективного розпізнавання комплементарних олігонуклеотидів.

Визначено робочі умови ДНК-біосенсора: робочу напругу відносно референтного електрода, концентрацію буферного розчину, концентрацію електрохімічного маркера, оптимальний діапазон робочих частот. Побудовано еквівалентну схему комірки, що моделює динаміку електрохімічних процесів в ній.

Продемонстровано можливість ДНК-сенсора визначати комплементарні олігонуклеотиди та дискримінувати олігонуклеотиди, які відрізняються однією однонуклеотидною заміною. Показано його високу селективність, чутливість і відтворюваність відгуку. Це дозволить в подальшому діагностування стійких до рифампіцину форм туберкульозу.

Результати цього розділу викладено у публікаціях:



- Development of impedimetric DNA biosensor for selective detection and discrimination of oligonucleotide sequences of the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* / M. Matsishin, O. Rachkov, A. Errachid [et al.] // *Sensors Actuators B Chem.* – 2016. – №222. – P. 1152–1158.
- Вплив характеристик системи тонкоплівковий перетворювач-буферний розчин на кондуктометричний біосенсор, створений на її основі / М. Мацишин, В. Пешкова, В. Мельник [та ін.] // *Сенсорна електроніка та мікросистемні технології.* – 2013. – Т10. – №2 . – С. 152–158.

## РОЗДІЛ 4

**РОЗРОБКА ГЕНОСЕНСОРА ППР ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ  
ПОСЛІДОВНОСТІ ГІБРИДНОГО ГЕНА BCR-ABL**

**4.1. Вибір оптимальної послідовності ДНК-проби для розпізнавання фрагменту гену *bcr-abl***

Вибір найбільш придатної пари мішень-проба для створення гібридизаційного ДНК сенсора є одним з найважливіших і складних кроків. Щоб вибрати довжину олігонуклеотидів, пов'язаних з геном *bcr-abl*, були проаналізовані послідовності ділянки стикування мРНК гібридного гена при перебудові e13a2 (b2a2), що містили однакову кількість нуклеотидів обох вихідних генів, від 9 до 15 основ кожного гена. Відомо, що між гуаніном та цитозином формуються 3 водневі зв'язки, в той час як між двома іншими основами аденіном та тиміном – тільки два. Таким чином, більш високий вміст G і C призводить до надійнішого розпізнавання комплементарних послідовностей. Як видно з табл. 4.1, олігонуклеотиди довжиною 22 основи і довші мають деяку перевагу в цьому відношенні.

Таблиця 4.1

**Варіанти довжини та послідовності олігонуклеотиду-проби і комплементарного олігонуклеотиду-мішені**

Довжина (кількість основ)	Послідовність проби	Послідовність мішені	GC, %
18	GAAGGGCTTTTGAACCTCT	AGAGTTCAAAAGCCCTTC	44
20	TGAAGGGCTTTTGAACCTCTG	CAGAGTTCAAAAGCCCTTCA	45
22	CTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGC	GCAGAGTTCAAAAGCCCTTCAG	50
24	GCTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGCT	AGCAGAGTTCAAAAGCCCTTCAGC	50
26	CGCTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGCTT	AAGCAGAGTTCAAAAGCCCTTCAGCG	50
28	CCGCTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGCTTA	TAAGCAGAGTTCAAAAGCCCTTCAGCGG	50
30	GCCGCTGAAGGGCTTTTGAACCTCTGCTTAA	TTAAGCAGAGTTCAAAAGCCCTTCAGCGGC	50

За допомогою веб-сервера DINAMelt [81,90,91] були розраховані зміни вільної енергії Гіббса при утворенні внутрішньомолекулярних вторинних структур ( $\Delta G_{\text{Self}}$ ), зазначених олігонуклеотидів-проб та олігонуклеотидів-мішеней, а також при гібридизації між ними, тобто при формуванні специфічних міжмолекулярних зв'язків ( $\Delta G_{\text{Hybr}}$ ). Як і очікувалося, величина зміни вільної енергії Гіббса при гібридизації відображає поступове посилення взаємодій при збільшенні довжини нуклеотидної послідовності табл. 4.2. При цьому приріст  $\Delta G_{\text{Hybr}}$ , при збільшенні довжини на кожні 2 основи, спочатку зростає, досягає максимального значення для олігонуклеотидів, що складаються з 22 та 24 основ, а потім починає зменшуватись.

Таблиця 4.2

**Зміни вільної енергії Гіббса при формуванні внутрішньоланцюгових вторинних структур різними за розміром ділянками гібридного гена *bcr-abl* ( $\Delta G_{\text{Self}}$  проби та  $\Delta G_{\text{Self}}$  мішені), а також гібридизації між ними ( $\Delta G_{\text{Hybr}}$ ).**

**Розрахунки проведено для наступних умов: 0,165 M Na<sup>+</sup> при 22°C**

Довжина (кількість основ)	$\Delta G_{\text{Self}}$ проби (ккал/мол)	$\Delta G_{\text{Self}}$ мішені (ккал/мол)	$\Delta G_{\text{Hybr}}$ (ккал/мол)	Приріст $\Delta G_{\text{Hybr}}$ в порівнянні з олігонуклеотидами коротшими на 2 основи
16			-20,2	
18	0,52	0,73	-23,1	2,9
20	0,52	0,72	-26,5	3,4
22	0,04	0,37	-30,2	3,7
24	-0,97	-0,27	-33,9	3,7
26	-1,38	-0,27	-37,4	3,5
28	-1,38	-0,27	-40,6	3,2
30	-1,91	-1,44	-43,6	3,0

Що ж стосується значень  $\Delta G_{\text{Self}}$ , то всі вони досить невеликі (для кожної довжини олігонуклеотидів вони в десятки разів менші відповідних значень  $\Delta G_{\text{Hybr}}$ ). Таким чином, можна зробити висновок, що первинна послідовність ділянки стикування мРНК гібридного гена *bcr-abl* при перебудові e13a2 (b2a2) в межах 18-30 нуклеотидів не сприяє формуванню стабільних внутрішньоланцюгових вторинних структур, в той час як міжланцюгова гібридизація має бути дуже ефективною.

Враховуючи всі вище наведені параметри, олігонуклеотид GCT GAA GGG CTT TTG AAC TCT GCT довжиною 24 основи було обрано як олігонуклеотид-пробу для формування біоселективного елемента біосенсора. Для іммобілізації на золотій сенсорній поверхні 5'-кінець даного олігонуклеотида був модифікований SH-групою та 6-метиленовим спейсером. Згаданий спейсер застосовують для запобігання значним стеричним перешкодам під час гібридизації біля сенсорної поверхні. Такий модифікований олігонуклеотид було названо *mod-Ph*. Повністю комплементарний до *mod-Ph* олігонуклеотид AGC AGA GTT САА ААG ССС ТТС АGС було названо *P1*. Крім цього, використовувалися два частково комплементарних олігонуклеотида: перший з них BA190, являється комплементарним тільки до фрагмента *mod-Ph*, похідного від гена *abl*; інший - *Vcrex14*, – тільки до фрагмента гена *mod-Ph*, похідного від гена *bcr*. На Рис. 4.1 представлено найімовірніші варіанти міжмолекулярних дволанцюгових структур, що формуються в розчині при гібридизації, за участю вище згаданих олігонуклеотидів (отримані також за допомогою веб-сервера DINAMelt).

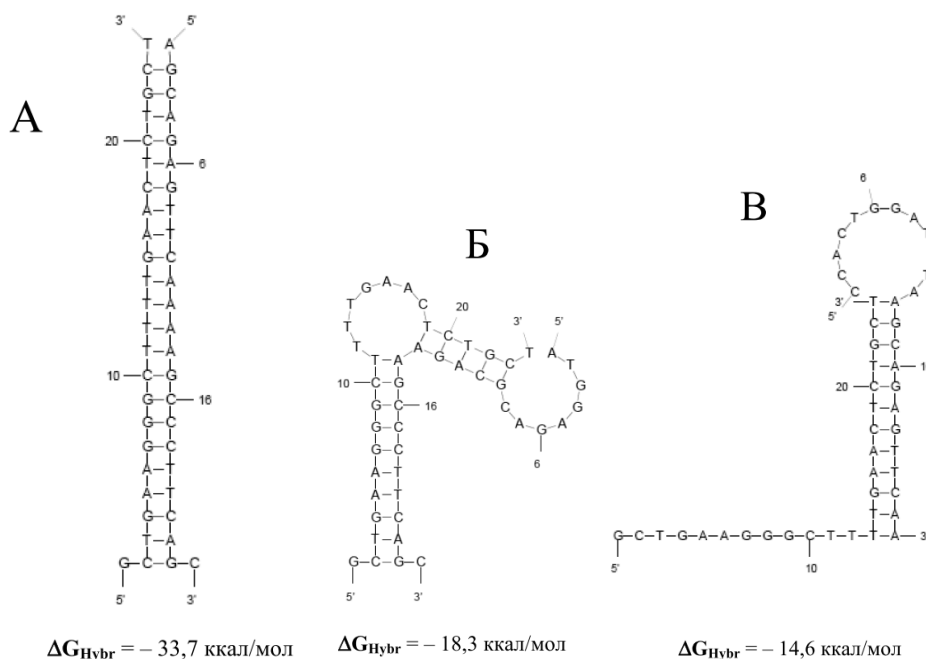


Рис. 4.1. Формування найбільш ймовірних міжмолекулярних дволанцюгових структур між пробою *mod-Ph*, та олігонуклеотидами-мішенями *P1*(А), *BA190* (Б), *Vcrex14* (В), при гібридизації у буферному розчині. Розрахунки проведено для наступних умов: 0,165 М Na<sup>+</sup> при 22 °С

#### 4.2. Дослідження процесу гібридизації ДНК за допомогою спектроскопії ППР

Створення ДНК біосенсора починається з іммобілізації олігонуклеотидів-проб на золотій сенсорній поверхні. Олігонуклеотид-проба *mod-Ph* безпосередньо зв'язується з золотою поверхнею тіольною групою. Процес іммобілізації олігонуклеотидів на сенсорній поверхні викликає формування відгуку ППР (рис. 4.2), розмір якого дозволяє визначити величину поверхневої густини іммобілізованих проб, яка є важливою характеристикою біосенсора. Наприклад, після інкубації протягом однієї години 1 мкМ розчину *mod-Ph* вона становила близько 112 нг/см<sup>2</sup>, а після інкубації 2 мкМ розчину *mod-Ph* – 129 нг/см<sup>2</sup>.

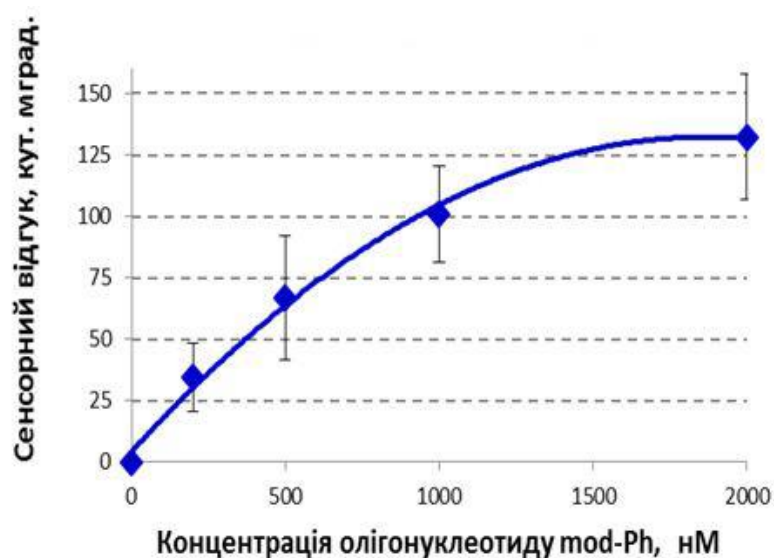


Рис. 4.2. Залежність відгуку ППР сенсора від концентрації олігонуклеотиду-проби *mod-Ph* при іммобілізації на золотій сенсорній поверхні

Як показано на рис. 4.3, величина поверхневої густини іммобілізованих проб впливає на ефективність їх гібридизації з олігонуклеотидами-мішенями. Рівень сенсорного відгуку при гібридизації **P1** з іммобілізованим *mod-Ph* зростає зі збільшенням поверхневої густини до 112 нг/см<sup>2</sup>, яку можна назвати оптимальною.

Подальше її збільшення практично не викликало очікуваного приросту рівня гібридизації. Це відбувається мабуть через те, що при досягненні деякої величини поверхневої густини іммобілізованих проб суттєво зростають як стеричні перешкоди, так і електростатичне відштовхування однойменно заряджених молекул олігонуклеотидів.

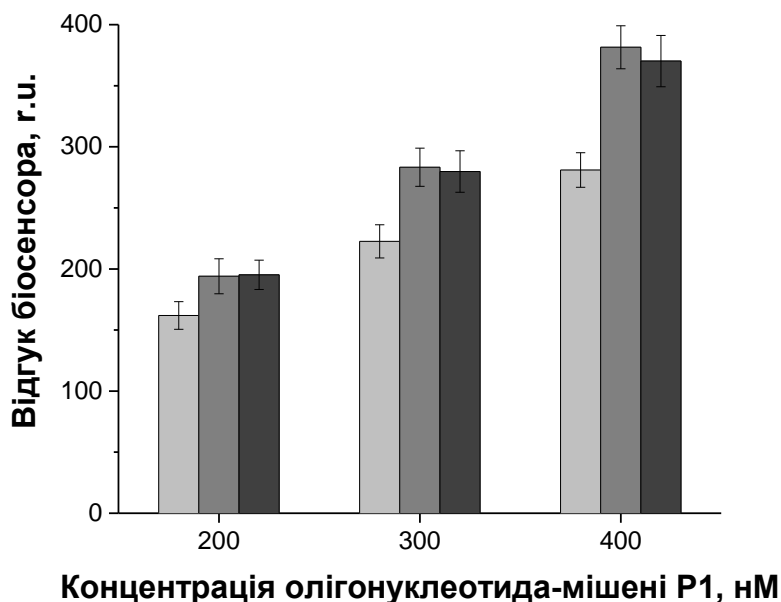


Рис. 4.3. Відгук біосенсора ППР при гібридизації з використанням різних концентрацій ДНК-мішеней *P1* в залежності від поверхневої густини ДНК-проб (■ 86 нг/см<sup>2</sup>, ■ 112 нг/см<sup>2</sup>, ■ 129 нг/см<sup>2</sup>)

Гібридизація на поверхні ДНК-біосенсора відбувається впродовж одиниць або десятків хвилин, залежно від концентрації мішені, після чого сигнал виходить на насичення. Якщо побудувати залежність величини насичення відгуку біосенсора від концентрації ДНК-мішені, то ми отримаємо криву наведену на рис. 4.4. На ній ми бачимо криву, схожу на гіперболу, що містить два діапазони концентрацій: квазілінійну ділянку та область насичення. Квазілінійний діапазон – це основна робоча область, в межах якої можна забезпечити аналіз наявності олігонуклеотиду-мішені і визначити її концентрацію.

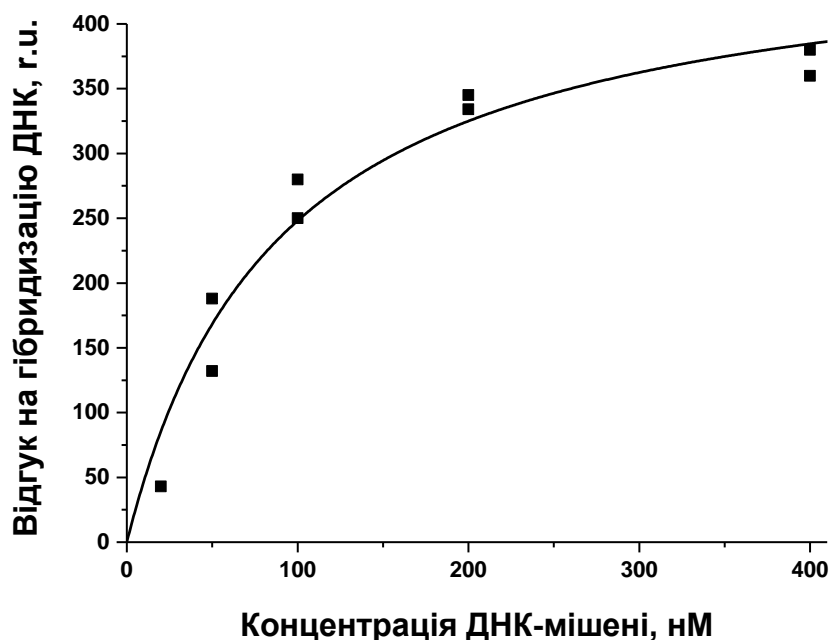


Рис. 4.4. Залежність відгуку ДНК-сенсора від концентрації олігонуклеотидів-мішеней *P1* при їх гібридизації з іммобілізованими олігонуклеотидами-пробами *mod-Ph* в буферному розчинні  $2\times\text{SSC}$

Як вже було зазначено, ефективні гібридизаційні ДНК-сенсори повинні бути настільки селективними, щоб розрізняти невеликі зміни послідовності ДНК (аж до заміни всього однієї нуклеотидної основи). Загальна концепція досягнення селективності полягає в дискримінації ДНК-мішені завдяки різниці енергії її гібридизації з пробою. Тому чим більша різниця енергії гібридизації пар ДНК тим більша дискримінація по границі детектування у різних ДНК-мішеней буде досягнута. Крім того, можлива дискримінація по інших характеристиках концентраційної залежності, наприклад насиченню відгуку на ДНК послідовність. За допомогою вибору буферного розчину цю різницю можна посилити, наприклад, зменшивши іонну силу аналізованого розчину.

На рис. 4.5 продемонстровано дискримінацію олігонуклеотидів *P1*, *TC*, *Vcrex14* в  $\text{SSC}$  буферних розчинах різної кратності. Олігонуклеотид *TC* не

розпізнається ні в  $2\times SSC$ , ні в  $0.5\times SSC$ , навіть у великих концентраціях. Дискримінація олігонуклеотидів *P1*, *Vcrex14* досягається за рахунок різної чутливості сенсора до них. В той час як в  $2\times SSC$  буферному розчині дискримінація не відбувається (спостерігаються значні сенсорні відгуки при введенні обох мішеней), у розчині  $0,5\times SSC$  спостерігається значний сенсорний відгук тільки при введенні повністю комплементарного олігонуклеотида *P1*.

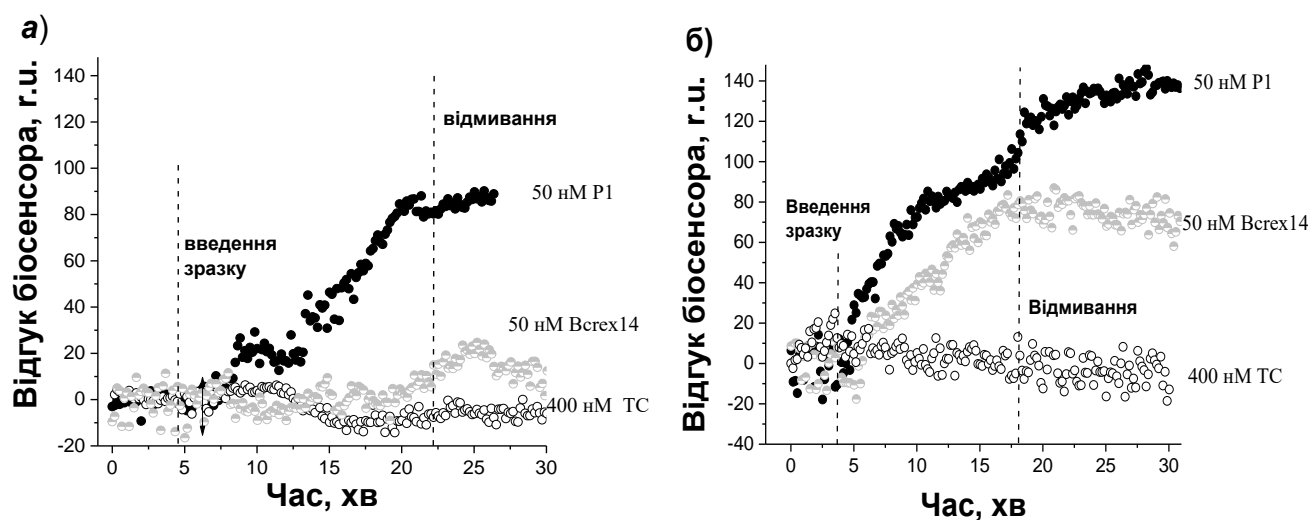


Рис. 4.5. Сенсограми ППР, що представляють динаміку гібридизації *P1*, *Vcrex14*, *TC* з іммобілізованими пробами *mod-Ph* в буферних розчинах  $0,5\times SSC$  (а) та  $2\times SSC$  (б)

Більше того, використання буферного розчину низької концентрації ( $0,5\times SSC$ ) може забезпечити дискримінацію *P1*, *Vcrex14* по рівню насичення сигналу. У випадку детектування повністю комплементарних олігонуклеотидів *P1* сигнал біосенсора може бути дуже значним і становити до 400 г.у. В той час як насичення сигналу біосенсора при детектуванні *Vcrex14* не перевищує 150 г.у. Отже, виникає додатковий метод розпізнавання олігонуклеотидів на високих концентраціях, який полягає в тому, що частково некомплементарний олігонуклеотид не може забезпечити відгук вище рівня насичення сигналу. Тобто будь-який біосенсорной



сигнал в буферному розчині  $0,5 \times SSC$ , що статистично значимо перевищує відгук насичення олігонуклеотида *Bcrex14*, буде відповідати більш комплементарному олігонуклеотиду *P1*.

Для аналізу роботи біосенсора було використано модель Ленгмюра, яка приваблива своєю простотою і універсальністю. В рамках моделі одна з компонент комплексу (B) іммобілізована на поверхні, а інша (A) буде знаходитись в вільному стані в розчині. Загальна схема взаємодії може представлятися в наступному вигляді:



Вона еквівалентна диференціальному рівнянню:

$$\frac{d[AB]}{dt} = \frac{k_a[A]([AB]_{\max} - [AB])}{a \cdot b} - k_d[AB]. \quad (4.2)$$

Цей вираз складається з компонент, що відповідають асоціації та дисоціації. Згідно означення константи асоціації швидкість утворення комплексу AB ( $d[AB]/dt$ ) пропорційна добутку константи асоціації на концентрації відповідних складових, комплексу з врахуванням стехіометричних коефіцієнтів. Крім асоціації наявна дисоціація, яка пропорційна кількості утвореного комплексу. Вона описується другим доданком.

Це диференційне рівняння має два розв'язки: зростаючий та спадний. Вид розв'язку залежить від початкових умов:

- якщо в момент часу  $t=0$  концентрація комплексу  $[AB]=0$ , а концентрація вільного компонента становить деяку величину  $[A]$ , то отримаємо рівняння, що відповідає зростаючій експоненті:

$$[AB] = \frac{k_a[A] \cdot [AB]_{\max}}{a \cdot b \cdot (k_d + [A] \cdot \frac{k_a}{a \cdot b})} \left( 1 - e^{-(k_d + [A] \cdot \frac{k_a}{a \cdot b})t} \right); \quad (4.3)$$

- при відсутності вільного агенту в розчині  $[A] = 0$  в момент часу  $t=0$ , ми отримуємо спадаючу експоненту, що починається зі значення  $[AB] = [AB]_0$ :

$$[AB] = [AB]_0 e^{-k_d t}. \quad (4.4)$$

Проаналізуємо детальніше розв'язок в вигляді зростаючої експоненти. Її амплітуда відповідає класичній ізотермі Ленгмюра. Рівняння кривої можна записати в традиційному вигляді через ефективні та рівноважні константи (в нашому випадку стехіометричні коефіцієнти  $a=b=1$ , в інших випадках вони входять в вираз «ефективної» константи асоціації  $k_a^{\text{eff}} = k_a / (a \cdot b)$ ), кінцевий вираз можна переписати як:

$$[AB]_{\text{sat}} = \frac{[A] \cdot [AB]_{\text{max}}}{(K_d + [A])}. \quad (4.5)$$

Для вивчення гібридизації використовується два типи діаграм: ППР сенсограми і концентраційні залежності. Концентраційна діаграма є наслідком аналізу багатьох сенсограм ППР, вона відображає залежність рівня насичення сигналу від концентрації ДНК-мішені в розчині. Для побудови концентраційної діаграми необхідно мати інструмент, який забезпечить експоненційне наближення зростаючої ділянки сигналу і дозволить отримати значення насичення та інкремент експоненти. Ці дані використовуються у розрахунку динамічних констант і побудові концентраційної діаграми.

Рівняння ізотерми Ленгмюра може бути лінеаризовано і приведено до вигляду рівняння Скетчарда:

$$\frac{[AB]_{\text{sat}}}{[A]} = \frac{[AB]_{\text{max}}}{K_d} - \frac{[AB]_{\text{sat}}}{K_d}. \quad (4.6)$$

Це дуже зручний механізм аналізу концентраційної діаграми, що прямо і легко дозволяє отримати рівноважні константи гібридизації для подальшого їх використання. Рис. 4.6 демонструє як графічно отримати їх значення.

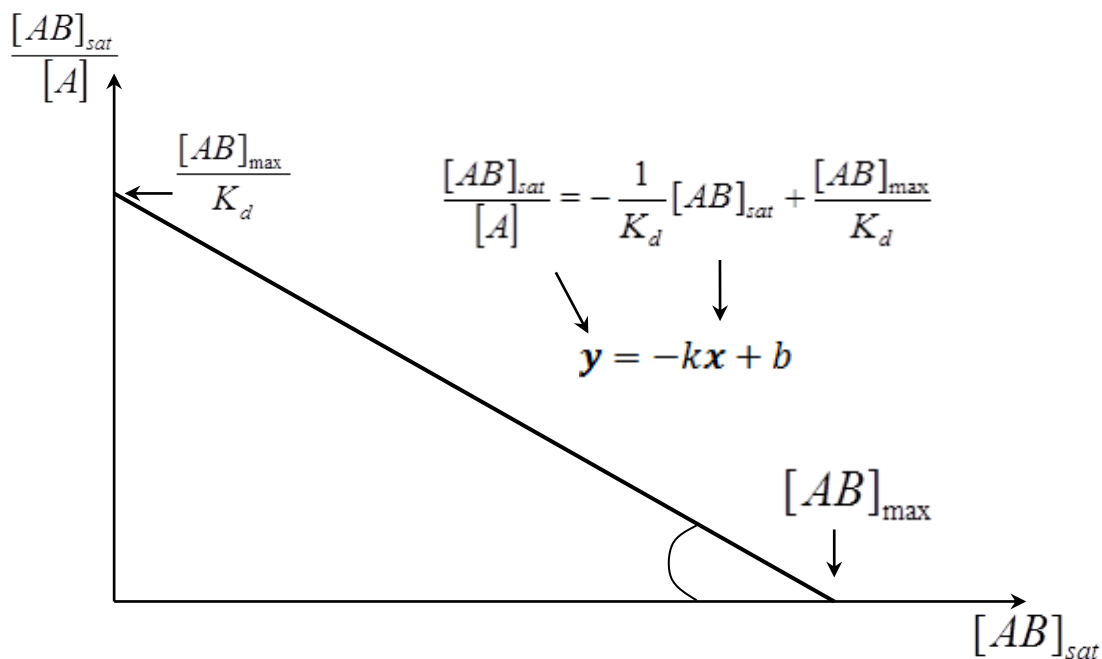


Рис. 4.6. Діаграма Скетчарда та її інформативні складові

Для визначення динамічних констант спочатку необхідно отримати рівноважну константу дисоціації  $K_d$  та значення насичення ізотерми Ленгмюра  $[AB]_{max}$ . Крім того, необхідно визначити показники зростаючої експоненти  $S$  та відповідні їм значення  $[AB]_{sat}$ . З основного рівняння зростаючої експоненти ми можемо записати показник експоненти  $S$  та її амплітуду  $[AB]_{sat}$  як:

$$S = k_d + [A] \cdot k_a^{ef}, \quad [AB]_{sat} = \frac{k_a^{ef} [A] \cdot [AB]_{max}}{S} . \quad (4.7)$$

Звідки ефективну динамічну константу асоціації можна виразити як:

$$k_a^{ef} = \frac{[AB]_{sat} \cdot S}{[A] \cdot [AB]_{max}} . \quad (4.8)$$

Підставивши значення цієї константи в вираз інкремента отримаємо:

$$S = k_d + [A] \cdot k_a^{ef} = k_d + [A] \cdot \frac{[AB]_{sat} \cdot S}{[A] \cdot [AB]_{max}} = k_d + \frac{[AB]_{sat} \cdot S}{[AB]_{max}} . \quad (4.9)$$

Відповідно динамічну константу дисоціації можна записати як:

$$k_d = S - \frac{[AB]_{sat} \cdot S}{[AB]_{max}} = \frac{([AB]_{max} - [AB]_{sat}) \cdot S}{[AB]_{max}}. \quad (4.10)$$

Використавши діаграму Скетчарда для аналізу залежностей відгуків біосенсора від концентрації *P1* та *Vcrex14* (рис. 4.7 та рис. 4.8), отримано рівноважні константи гібридизації та оцінено кількість доступних ДНК-проб (1 г.у. відповідає  $2 \times 10^8$  молекул  $\text{см}^{-2}$ ) в залежності від концентрації буферного розчину. Отримані дані наведено в табл. 4.3.

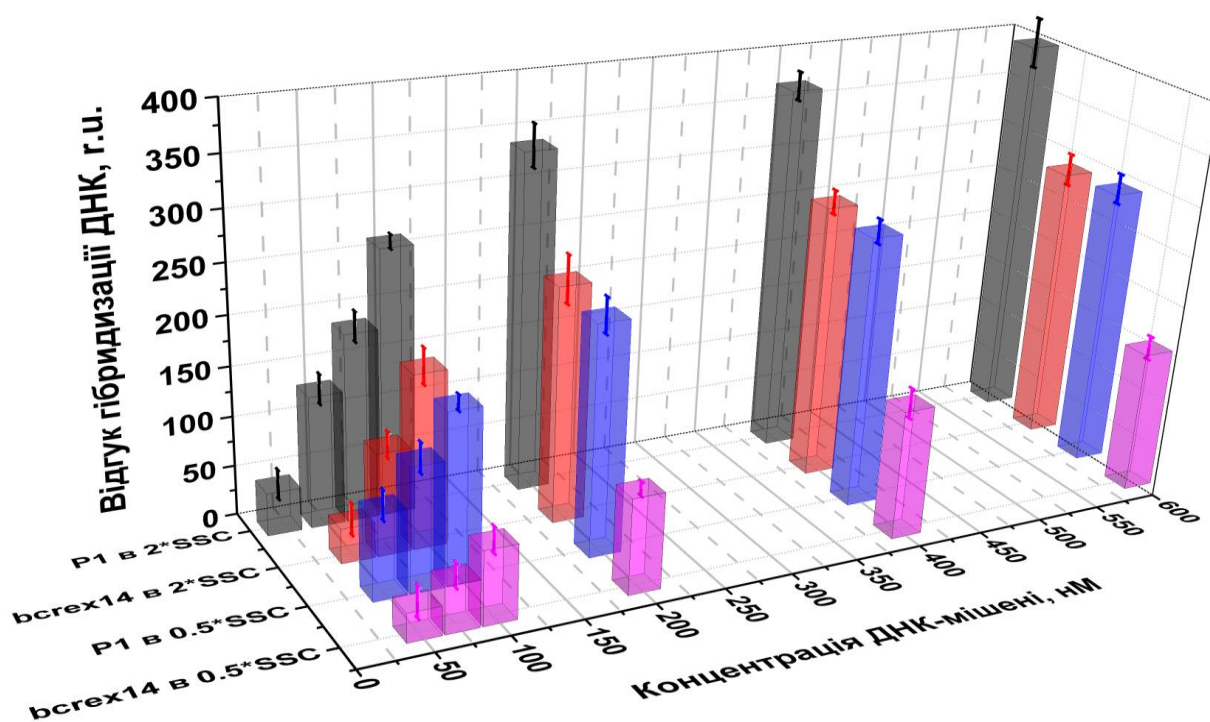


Рис. 4.7. Залежність біосенсорного відгуку від концентрації *P1* або *Vcrex14* в буферних розчинах  $0,5 \times \text{SSC}$  або  $2 \times \text{SSC}$

Як можемо переконатися, кількість ДНК-проб, що можуть вступити в взаємодію з ДНК-мішенями, залежить і від ступеню комплементарності послідовностей, і від складу гібридизаційного буферного розчину.

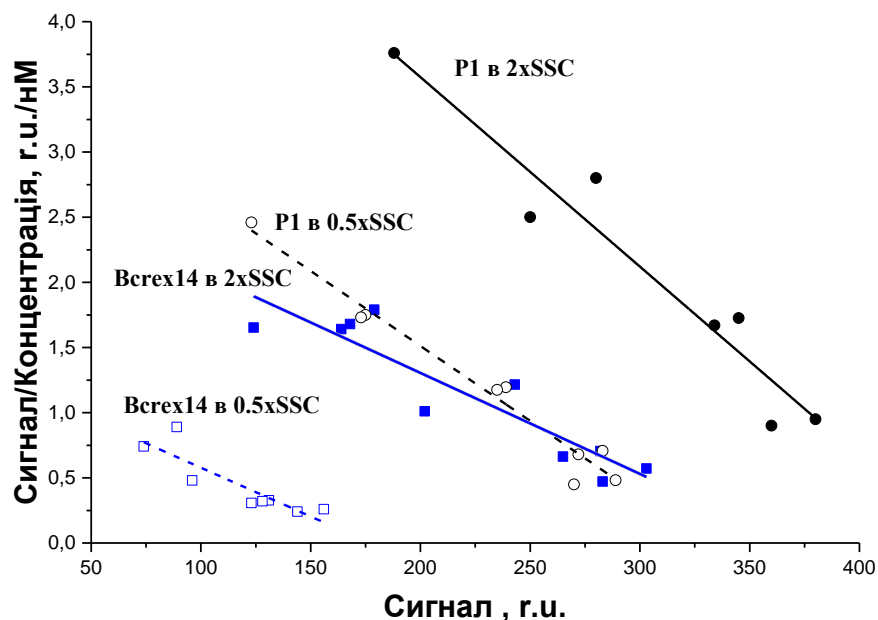


Рис. 4.8. Діаграми Скетчарда при аналізі гібридизації *P1* та *Vcrex14* в буферних розчинах  $2\times\text{SSC}$   $0,5\times\text{SSC}$

Збільшення жорсткості умов гібридизації неоднаково впливає на процеси гібридизації за участю повністю і частково комплементарних олігонуклеотидів. Внаслідок зменшення іонної сили кількість доступних олігонуклеотидів-проб для взаємодії з повністю комплементарними олігонуклеотидами-мішенями *P1* зменшилась лише на  $(445-332)/445\approx 25\%$ , а у випадку частково комплементарних олігонуклеотидів-мішеней *Vcrex14* – на  $(326-177)/326\approx 52\%$ .

Таблиця 4.3

**Параметри, отримані при гібридизації олігонуклеотидів *P1* або *Vcrex14* з ДНК-пробою в буферних розчинах  $2\times\text{SSC}$  та  $0,5\times\text{SSC}$**

	$[\text{AB}]_{\text{max}}$ , г.у.	$K_d$ , нМ	$\Delta G_{Kd}$ (ккал/моль)
<i>P1</i> і <i>mod-Ph</i> в $2\times\text{SSC}$	445	69	9,83
<i>Vcrex14</i> і <i>mod-Ph</i> в $2\times\text{SSC}$	368	129	9,46
<i>P1</i> і <i>mod-Ph</i> в $0,5\times\text{SSC}$	332	87	9,69
<i>Vcrex14</i> і <i>mod-Ph</i> в $0,5\times\text{SSC}$	178	134	9,43

При цьому величини рівноважних констант майже не змінюються в залежності від буферного розчину і комплементарності пари, а їх значення відповідає відчутно меншій енергії ніж та, що була отримана за допомогою сервісу DINAMelt для гомогенної системи. Це нашоує на думку, що отримані таким чином рівноважні константи скоріше характеризують особливості доступності до та взаємодії з ДНК-пробою на сенсорній поверхні. Отже, збільшення жорсткості умов гібридизації здатне забезпечити дискримінацію олігонуклеотидів, а рівень насичення відгуку біосенсора буде наочно її відображати.

Представлений експериментальний підхід дискримінації різних послідовностей нуклеїнових кислот за рахунок збільшення жорсткості умов гібридизації не є абсолютним: біосенсор може демонструвати деяку чутливість до частково комплементарних ДНК, особливо при їх дуже високій концентрації. Тому в даній роботі було запропоновано ще один метод дискримінації ДНК – метод термодискримінації.

#### **4.3. Розпізнання комплементарних олігонуклеотидів за допомогою контрольованої зміни температури на базі спектрометра ППР**

Термодискримінація є перспективним підходом розрізнення частково та повністю комплементарних послідовностей нуклеїнових кислот, що базується на різних величинах енергії взаємодії ( $\Delta G$ ) та температури плавлення ( $T_m$ ) відповідних дуплексів. Основою такого підходу служить великий масив знань щодо процесу плавлення дволанцюгової ДНК під впливом підвищення температури. На сьогоднішній день існує ряд програм, які здатні визначати температуру плавлення дволанцюгової ДНК будь-якої визначеної нуклеотидної послідовності, що знаходиться у гомогенній системі (у розчині), в тому числі і використані в даній

роботі програми веб-сервера DINAMelt. За допомогою цього сервісу були отримані термодинамічні параметри для застосування термодискримінації: зміна енергії Гіббса та температура плавлення (табл. 4.4). Відчутна різниця температур плавлення складає основу для реалізації термодискримінації повністю та частково комплементарних олігонуклеотидів.

Таблиця 4.4.

**Оцінки за допомогою веб-сервера DINAMelt енергії Гіббса гібридизації досліджуваних олігонуклеотидів для  $C_{\text{днк}} = 200$  нМ,  $[Na^+] = 0.4$  М,  $[Mg^{++}] = 0$  М**

Проба і мішень	$\Delta G$ (ккал/моль)	$T_m$ при 200 нМ
<i>mod-Ph</i> і <i>P1</i>	-33.7	64.0 °C
<i>mod-Ph</i> і <i>Vcrex14</i>	-14.6	39.2 °C

Наведені дані свідчать, що в розчині при температурі 30 °C обидві пари досліджуваних олігонуклеотидів утворюють стійкі дволанцюгові структури, а при підвищенні температури до ~40 °C – значна частина дуплексів *mod-Ph/Vcrex14* плавиться, тоді як повністю комплементарні дуплекси *mod-Ph/P1* залишаються стабільними. Гібридизація в гетерогенній системі (при наявності твердої поверхні, на якій іммобілізують олігонуклеотиди-проби) відбувається менш ефективно, тому абсолютні значення ( $\Delta G$ ) та ( $T_m$ ) мають бути меншими, ніж зазначені в табл. 4.4. Тим не менше, з великою імовірністю можна припустити, що якісна поведінка цих двох пар олігонуклеотидів буде подібною: при поступовому підвищенні температури спочатку будуть руйнуватися дуплекси *mod-Ph/Vcrex14* (частково комплементарна пара олігонуклеотидів довжиною 24 основи, що має 12-ти основний комплементарний фрагмент).

Реалізація такого підходу за допомогою спектрометра ППР виглядала наступним чином:

- спочатку був визначений рівень сенсорного відгуку, що відповідає гібридизації 200 нМ олігонуклеотидів-мішеней з іммобілізованими олігонуклеотидами-пробами при початковій температурі 30 °С;
- наступним кроком стала промивка біоселективного елементу біосенсора ППР буферним розчином заданої температури (наприклад 40 °С) протягом певного періоду часу (в цій роботі 5 хв).

В результаті цієї процедури слабкі дволанцюгові комплекси ДНК розпадаються і буферний розчин, що протікає через вимірювальну комірку, видалив відокремлені олігонуклеотиди. Тому після такого вимивання і подальшого охолодження вимірювальної комірки до початкової температури рівень сенсорного відгуку відображав тільки ту кількість дволанцюгових структур, яка не розплавилась.

До спектрометра ППР «Плазмон 6», який використовували в даній роботі, співробітниками Інституту фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України за нашої участі було створено терморегульовану вимірювальну комірку і відповідне програмне забезпечення. Ця комірка здатна реалізувати швидке нагрівання буферного розчину до заданої температури і контролювати її з точністю до 0,1 °С; крім того, з її допомогою можна чітко відслідковувати процес охолодження буферного розчину для визначення моменту повернення до початкової температури. В такій комплектації спектрометр ППР дозволяє проводити термодискримінацію повністю комплементарного олігонуклеотида *P1* від частково комплементарного *Vcrex14*.

Для того щоб забезпечити цю дискримінацію по температурі плавлення подвійної спіралі ДНК потрібно знайти таке значення температури при якому комплекс *mod-Ph* та *Vcrex14* буде розділено, а повністю комплементарна послідовність *P1* буде все ще надійно зв'язана з пробом *mod-Ph*. Для вирішення цієї



задачі було здійснено експеримент по плавленню подвійної спіралі ДНК утвореної пробами *mod-Ph* та *Vcrex14* та *mod-Ph* та *P1* при температурах від 30 °С до 65 °С з кроком у 5 °С. Дискримінацію олігонуклеотидів *P1* та *Vcrex14* було продемонстровано при температурі 40 °С, відповідні сенсограми наведено на рис. 4.9.

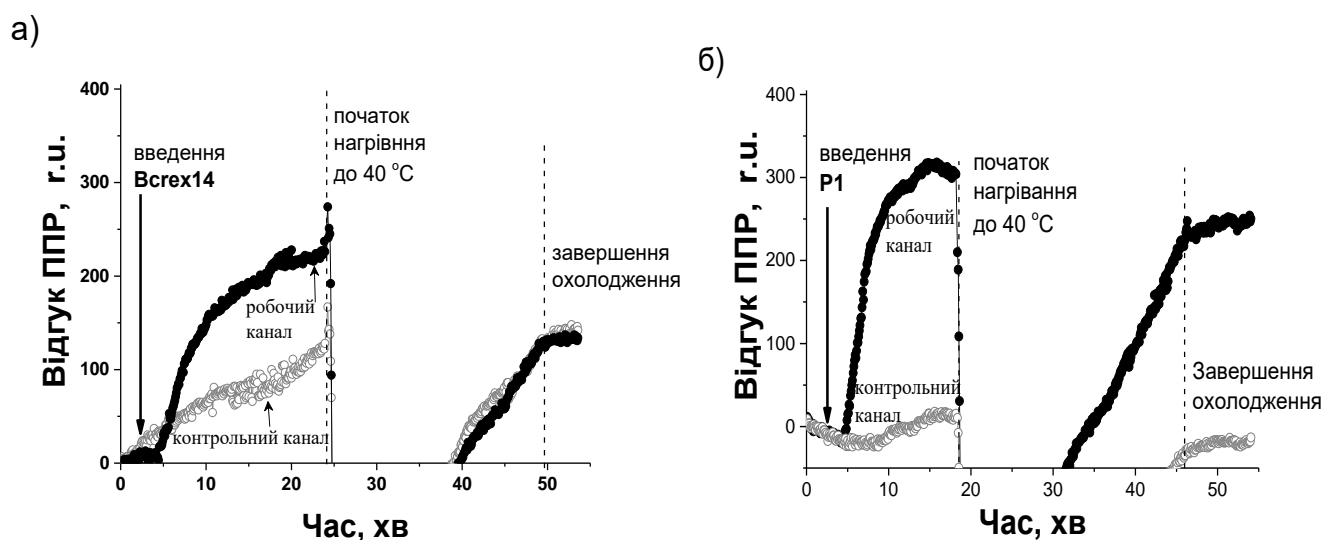


Рис. 4.9. Дискримінація олігонуклеотидів *Vcrex14* (а) та *P1* (б) за допомогою контрольованої зміни температури в буферному розчині 2×SSC, шляхом плавлення їх комплексів з ДНК-пробою

Після нагрівання буферного розчину до 40 °С дволанцюгові структури, утворені частково комплементарними олігонуклеотидами *Vcrex14*, розплавляються, і впродовж 5 хв відбувається практично повне вимивання останніх (сигнал ППР повертається до рівня сигналу, що спостерігали до введення у вимірювальну комірку олігонуклеотидів *Vcrex14*). У випадку комплементарних олігонуклеотидів *P1* ситуація протилежна: після аналогічної процедури гібридизації, нагрівання та повернення температури до початкового рівня, різниця сенсорних відгуків робочого та контрольного каналів практично така ж як і та, що спостерігали при початковій гібридизації. Співвідношення зазначених сенсорних відгуків є тим аналітичним

показником, що відображає ступінь збереження дволанцюгових структур, сформованих олігонуклеотидами, а його залежність від температури для різних пар олігонуклеотидів показує той діапазон температури, в якому можна реалізувати термодискримінацію повністю та частково комплементарних олігонуклеотидів.

Як видно з рис. 4.10, дволанцюгові структури, сформовані повністю комплементарними олігонуклеотидами *P1* (та *mod-Ph*) зберігаються без істотних змін до 50 °С, а дволанцюгові структури, сформовані частково комплементарними олігонуклеотидами *Vcrex14* (та *mod-Ph*), починаючи з 40 °С, практично повністю руйнуються. Таким чином, можна стверджувати, що термодискримінація зазначених олігонуклеотидів ефективно відбувається в діапазоні температур від 40 °С до 50 °С.

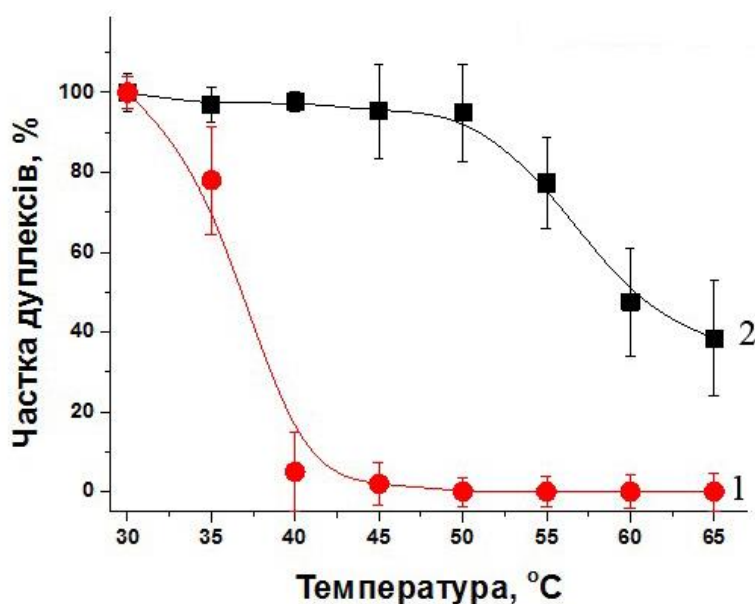


Рис. 4.10. Результати температурного плавлення дволанцюгових ДНК утворених пробою *mod-Ph* та олігонуклеотидами-мішенями *Vcrex14* (1) та *P1* (2).

Даний метод дуже гнучкий, оскільки за допомогою розробленого пристрою температуру можна контролювати з точністю до 0,1 °С, а час промивання нагрітим буфером можна вибрати практично без обмежень.

#### 4.4. Підсилення сигналу ППР за допомогою наночастинок золота

Підсилення сигналу за допомогою наночастинок золота може суттєво покращити функціональні показники звичайної спектрометрії ППР. Наночастинки золота мають відчутно більший розмір і масу ніж досліджувані олігонуклеотиди, а їх діелектрична проникність – значно більша, ніж у робочого буферного розчину. Все це викликає суттєве збільшення сигналу ППР. Використання наночастинок золота, модифікованих олігонуклеотидами комплементарними до тих олігонуклеотидів-проб, які були іммобілізовані на сенсорній поверхні, дозволило в процесі гібридизації забезпечити ще й і збільшення різниці сенсорних відгуків детектування специфічних та неспецифічних олігонуклеотидів-мішеней, і покращити межі детектування.

Головною проблемою розробки методу підсилення відгуку ППР за допомогою наночастинок є формування неспецифічного сенсорного сигналу або через агрегацію наночастинок золота (НЧЗ) і, як наслідок, їх осадження на сенсорну поверхню, або через безпосередню неспецифічну взаємодію НЧЗ з сенсорною поверхнею чи з іммобілізованими на ній компонентами. В обох випадках величина неспецифічного сигналу залежать від іонної сили і рН середовища, та поверхневої модифікації як самих наночастинок, так і сенсорної поверхні [78]. При цьому варто зауважити, що хімічна модифікація наночастинок може змінювати їх стійкість до агрегації. Це залежить від наявності в складі молекули-модифікатора сульфгідрильної групи та від знаку (+ чи –) її заряду [86,87]. Тіольовані олігонуклеотиди, з одного боку, здатні до формування надійного зв'язку з золотою поверхнею наночастинок, а з іншого, в середовищі з рН близьким до нейтрального,

вони мають від'ємний заряд, що додає агрегаційної стійкості до агрегації модифікованим НЧЗ.

Тому відтворюване отримання наночастинок з певною поверхневою густиною ДНК-проб є необхідним завданням при розробці підходу підсилення сигналу ППР. Для цього використовували одноланцюговий олігодезоксинуклеотид *P2-Cy3*, який на 5'-кінці має SH-групу, а на 3'-кінці – флуоресцентний барвник *Cy3* [SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-ACCCACAAGCGCCGACTGTTG-Cy3]. На жаль, прямий метод визначення поверхневої густини флуоресцентно мічених олігонуклеотидів неможливий тому, що НЧЗ ефективно гасять флуоресценцію [92]. Через це необхідно використовувати альтернативні, непрямі методи визначення. Суть методу, який ми назвали залишковим, полягає у визначенні різниці між концентрацією вільних олігонуклеотидів до і після іммобілізації. Для осадження НЧЗ з іммобілізованими на їх поверхні олігонуклеотидами необхідне центрифугування, при цьому в супернатанті залишаються тільки вільні (неіммобілізовані) олігонуклеотиди. Різниця між рівнем флуоресценції вихідного розчину олігонуклеотидів ( $F_{\text{вих}}$ ) і супернатанту, отриманого внаслідок центрифугування ( $F_{\text{супернат}}$ ), дозволяє визначити кількість іммобілізованих олігонуклеотидів та розрахувати ефективність іммобілізації.

Успішність застосування зазначеного експериментального підходу в значній мірі залежить від повноти осадження НЧЗ під час центрифугування. Потрібно, щоб ті фракції супернатанта, в яких буде визначатися концентрація вільних (неіммобілізованих) олігонуклеотидів, містили якомога менше НЧЗ. В зв'язку з цим був проведений відповідний пошук умов осадження НЧЗ. Відповідно, рис. 4.11 показує, що центрифугування розчину НЧЗ впродовж 30 хв при 12000 об/хв дає таке значення поглинання супернатанта при 520 нм, що є статистично нерозрізним від

значення поглинання деіонізованої води. Тому можна вважати, що ці умови забезпечують цілком задовільну повноту осадження НЧЗ.

Для орієнтованої іммобілізації олігонуклеотидів *P2* використовують здатність атому сірки в складі SH-групи формувати міцний хімічний зв'язок з атомами золота. Вимірювання рівня флуоресценції  $Cu^{2+}$  ковалентно приєднаного до олігонуклеотиду *P2* є відносно простим і надійним методом кількісного визначення концентрації олігонуклеотидів через наявність залежності між ними. Ця залежність, що виявилась лінійною в усьому діапазоні досліджуваних концентрацій (до 200 нМ), може бути описана рівнянням  $y = 11,0x + 41,8$ . Межа кількісного визначення складала 5 нМ *P2*- $Cu^{2+}$ . Це приблизно на три порядки краще, ніж при спектрофотометричному дослідженні немічених олігонуклеотидів (при  $\lambda = 260$  нм), яке дозволяє кількісно визначити лише мікромольярні концентрації олігонуклеотидів. Ці дослідження стали основою запропонованого методу визначення густини іммобілізованих олігонуклеотидів на поверхні НЧЗ (Патент України на корисну модель № 93555).

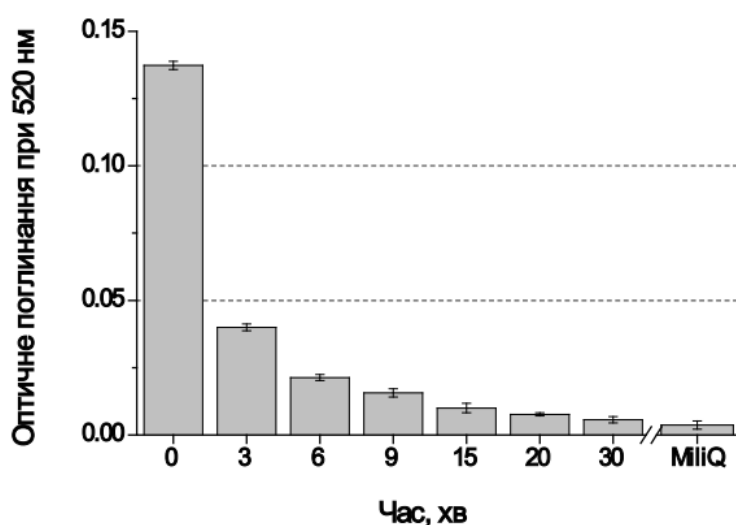


Рис. 4.11. Залежність рівня поглинання при 520 нм (рівня ефективності осадження НЧЗ) супернатанта розчину 3,25 нМ НЧЗ від часу центрифугування при 12000 об/хв

За допомогою розглянутого вище методу було досліджено, як деякі параметри впливають на рівень поверхневої густини іммобілізованих олігонуклеотидів. Так, при зменшенні величини рН збільшується ступінь протонованості фосфатних залишків олігонуклеотидів (тобто зменшується величина їх заряду), а збільшення іонної сили призводить до поступового екранування негативно заряджених фосфатних залишків олігонуклеотидів проти-іонами буферного розчину. В обох випадках електростатичне відштовхування між олігонуклеотидами зменшується, що має сприяти збільшенню їхньої поверхневої густини при іммобілізації на поверхні НЧЗ.

Дійсно, як видно на рис. 4.12 б) збільшення концентрації розчину  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  від 0 до 15 мМ призводить до збільшення ефективності іммобілізації  $P2\text{-Cu}_3$ . На жаль, подальше збільшення іонної сили не викликає відповідного підвищення ефективності іммобілізації.

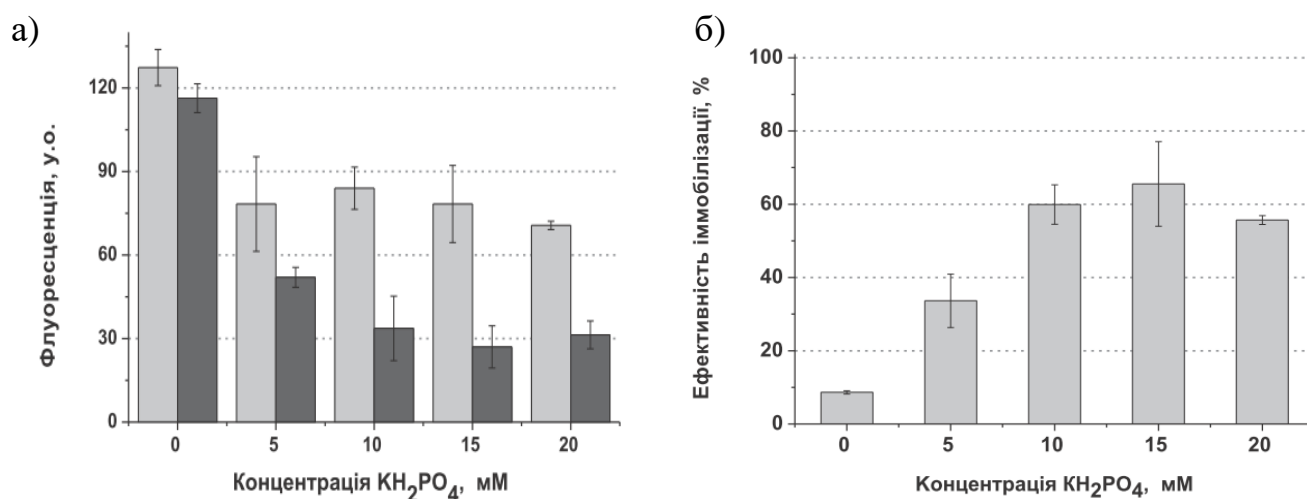




Рис. 4.12. Залежність рівня флуоресценції розчинів  $P2\text{-Cu}_3$  (а: вихідних розчинів  та супернатантів ), отриманих при центрифугуванні сумішей такої ж кінцевої концентрації  $P2\text{-Cu}_3$  з 3,25 нМ НЧЗ, після інкубації цих сумішей протягом 1 години при кімнатній температурі, від концентрації  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 4,0; залежність ефективності іммобілізації від концентрації  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (б)

Щоб з'ясувати можливу причину такого результату, провели спектрофотометричне дослідження впливу концентрації  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  на НЧЗ. Рис. 4.13 показує, що при додаванні  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  до кінцевої концентрації 10 мМ до немодифікованих НЧЗ їх спектр практично не змінюється, а от 20- і особливо 30-мілімолярні концентрації  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  викликають значне зменшення піку 520 нм характерного для одиничних (неагрегованих) наночастинок і появу «плеча» в діапазоні 600-800 нм, що свідчить про зближення наночастинок і початок процесу їх агрегації. Зрозуміло, що агрегація НЧЗ не може сприяти доступу олігонуклеотидів до поверхні наночастинок, що і позначається на ефективності їх іммобілізації при підвищенні концентрації  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  вище 15-20 мМ (рис. 4.12 б).

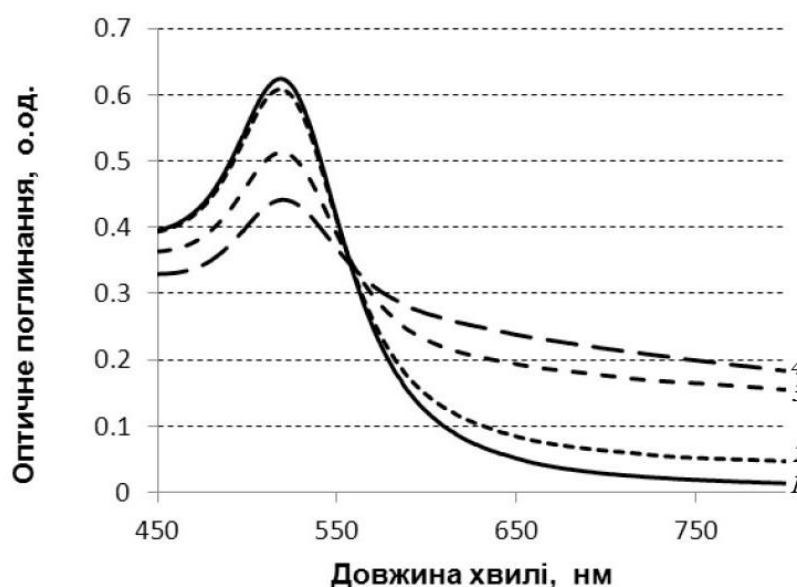


Рис. 4.13. Спектри поглинання немодифікованих, стабілізованих цитрат-іонами НЧЗ у воді (1) та при різних концентраціях  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (концентрації розчинів: 2 – 10 нМ; 3 – 20 нМ; 4 – 30 нМ)

Подібні результати були отримані і при використанні цитратного сольового буферного розчину, рН 7,2 (рис. 4.14) та карбонатного буферного розчину, рН 9,5 (рис. 4.15). Враховуючи те, що однократний цитратний сольовий буферний розчин

(1× SSC) містить 15 мМ цитрат натрію та 150 мМ NaCl, можна стверджувати, що оптимум ефективності іммобілізації  $P2-Cu3$  на поверхні НЧЗ спостерігається при концентрації іонів на рівні 15-20 мМ, незалежно від виду буферного розчину та величини рН. Наявність цього оптимуму в усіх трьох випадках обумовлена тим, що спочатку збільшення іонної сили до 15-20 мМ позитивно впливає на рівень іммобілізації олігонуклеотидів, а потім при більш високій іонній силі починається процес агрегації НЧЗ. І подальше підвищення рівня іммобілізації стає неможливим.

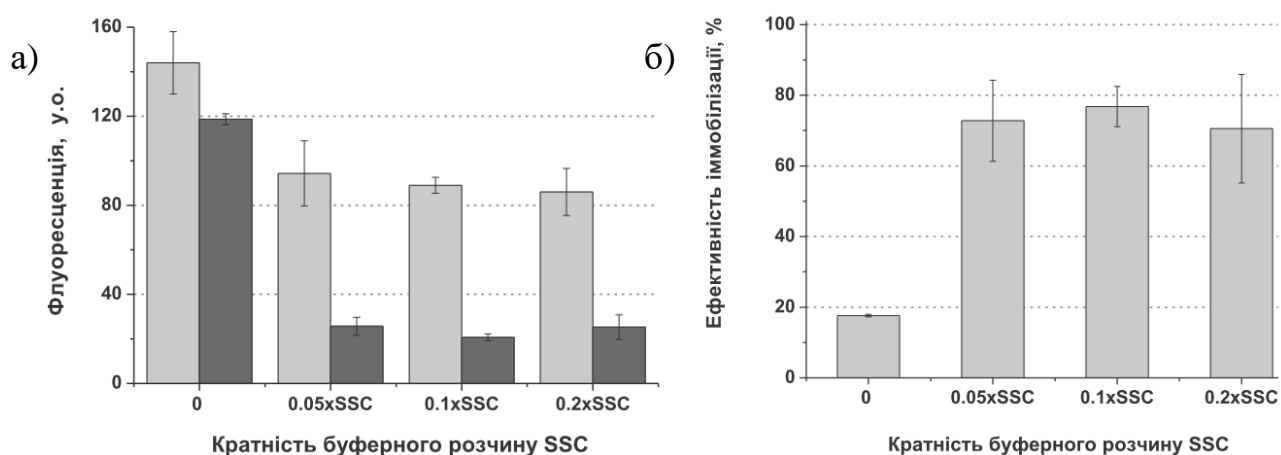




Рис. 4.14. Залежність рівня флуоресценції розчинів  $P2-Cu3$  (а: вихідних розчинів  та супернатантів ) , отриманих при центрифугуванні сумішей такої ж кінцевої концентрації  $P2-Cu3$  з 3,25 нМ НЧЗ після інкубації цих сумішей протягом 1 години при кімнатній температурі, від кратності цитратного сольового буферного розчину (рН 7,2); залежність ефективності іммобілізації від концентрації цитратного буферного розчину (б)

Той факт, що не спостерігалось явного впливу величини рН середовища, можливо, пояснюється доволі низькою концентрацією  $P2-Cu3$ . Розрахунки показують, що поверхнева густина іммобілізації при цьому приблизно дорівнювала 1 молекулі олігонуклеотида на 150–250 нм<sup>2</sup> поверхні НЧЗ. За таких обставин електростатичні взаємодії між молекулами олігонуклеотидів не можуть відігравати значної ролі.



Порівняння впливу різних буферних розчинів приводить до висновку, що величини ефективності іммобілізації  $P2-Cu3$  дуже близькі (з урахуванням величин стандартного відхилення від середнього значення) при використанні будь-якого з трьох середовищ. Найбільша ж середня величина ефективності іммобілізації  $P2-Cu3$  на поверхні НЧЗ була досягнута при використанні  $0,1 \times SSC$  буферного розчину.

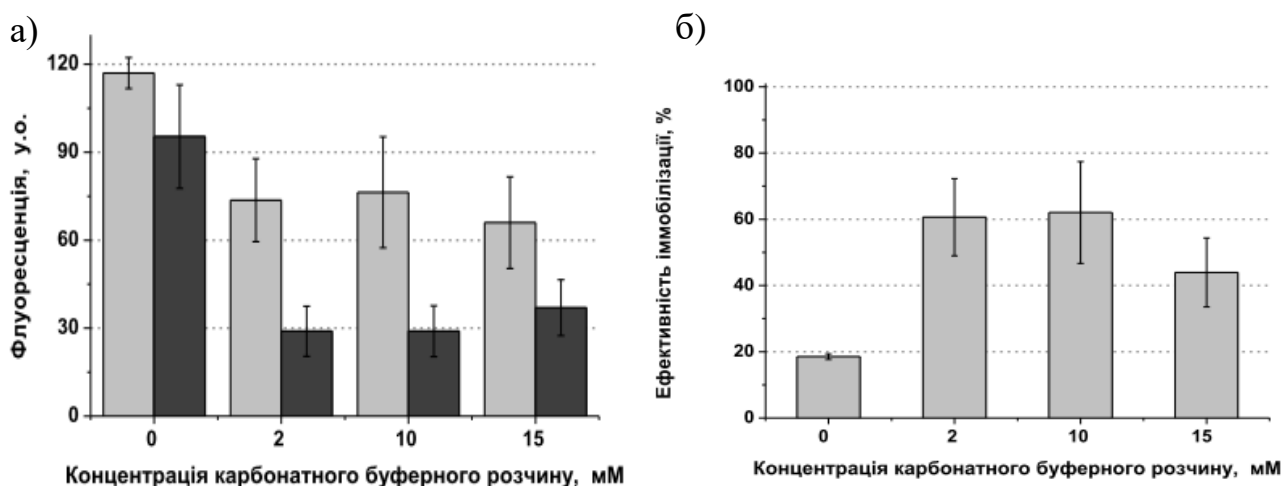




Рис. 4.15. Залежність рівня флуоресценції розчинів  $P2-Cu3$  (а: вихідних розчинів  та супернатантів ) , отриманих при центрифугуванні сумішей такої ж кінцевої концентрації  $P2-Cu3$  з 3,25 нМ НЧЗ, після інкубації цих сумішей впродовж 1 години при кімнатній температурі, від концентрації карбонатного буферного розчину (рН 9,5); залежність ефективності іммобілізації від концентрації карбонатного буферного розчину (б)

Тому саме  $0,1 \times SSC$  буферний розчин був обраний як середовище для дослідження залежності поверхневої густини іммобілізації  $P2-Cu3$  від концентрації олігонуклеотидів при інкубації протягом 1 години при кімнатній температурі. Як видно на рис. 4.16, дана залежність має лінійний характер в діапазоні 5–50 нМ. Величина поверхневої густини при 50 нМ  $P2-Cu3$  досягає приблизно 13,5 молекул на одну наночастинку або 1 іммобілізовану молекулу на  $40 \text{ нм}^2$ .

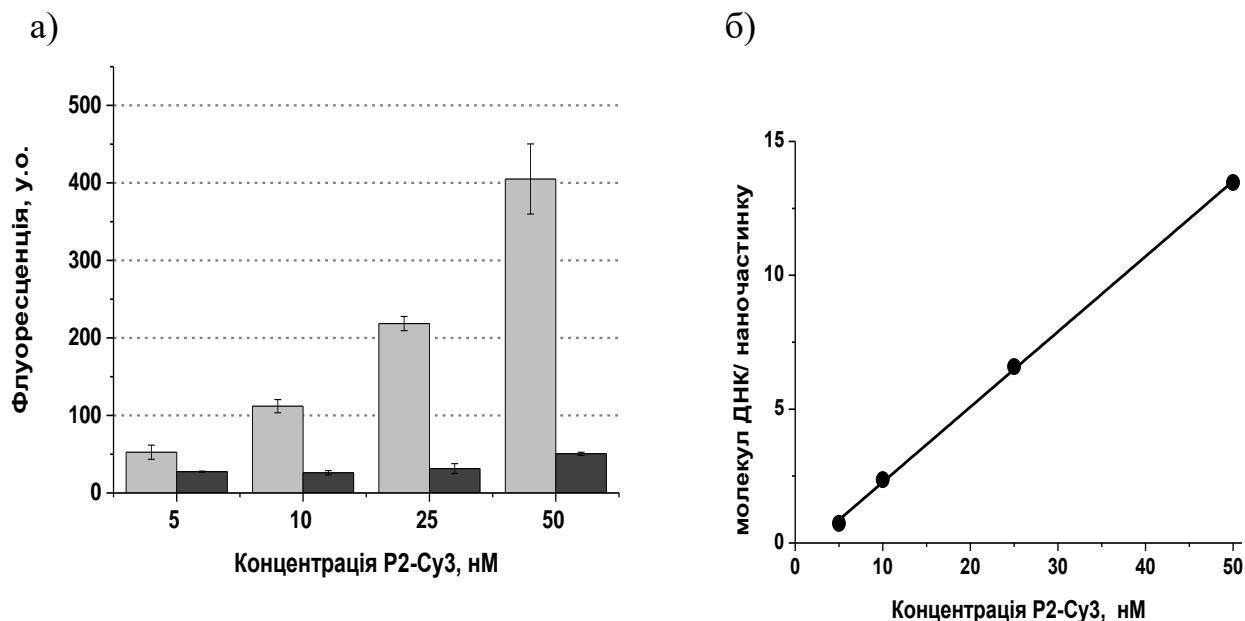




Рис. 4.16. Залежність рівня флуоресценції розчинів *P2-Cu3* (а: вихідних розчинів  та супернатантів ), отриманих при центрифугуванні сумішей відповідних концентрацій олігонуклеотидів з 3,25 нМ AuNPs після інкубації цих сумішей протягом 1 години в  $0,1 \times \text{SSC}$  при кімнатній температурі, від концентрації *P2-Cu3*; залежність поверхневої густини іммобілізації *P2-Cu3* від їх концентрації (б)

Проведення такого ж дослідження у воді, як можна було очікувати дало значно нижчий рівень іммобілізації. Поверхнева густина при 50 нМ *P2-Cu3* не досягає навіть величини 3 молекули на одну наночастинку, тобто на 1 іммобілізовану молекулу припадає  $200 \text{ nm}^2$ . Збільшення часу інкубації олігонуклеотидів з НЧЗ у воді при кімнатній температурі до 20 годин призводить до суттєвого поліпшення досліджуваного показника (рис. 4.17). Ця величина майже співпадає з тою, що отримана після інкубації протягом 1 години в  $0,1 \times \text{SSC}$ .

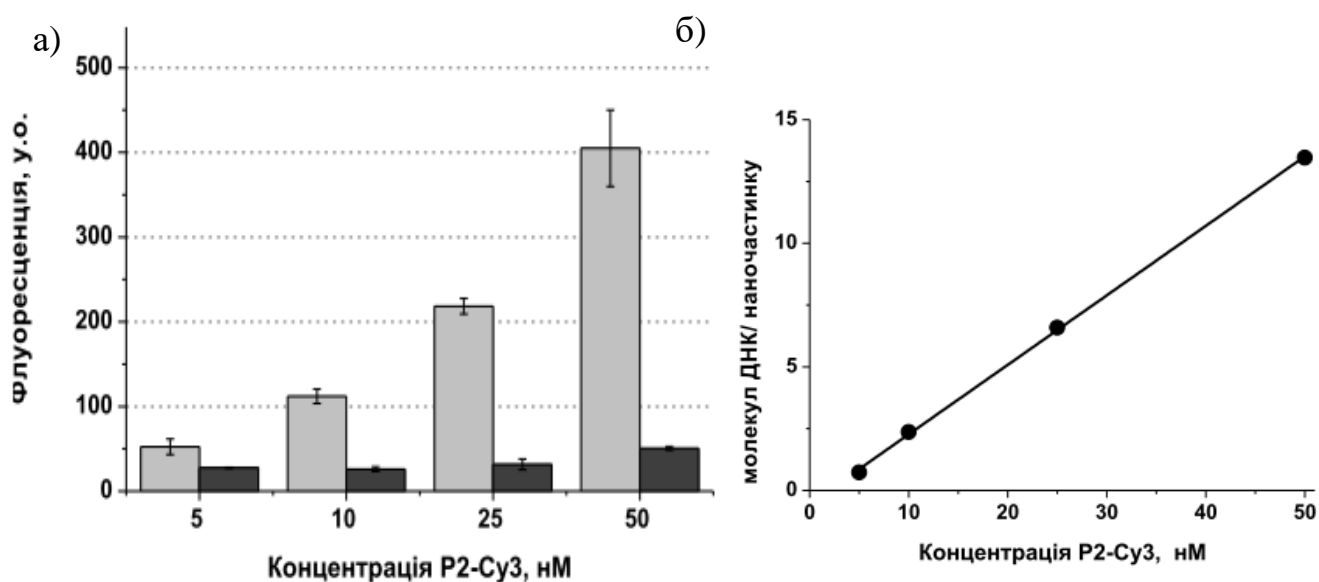


Рис. 4.17. Залежність рівня флуоресценції розчинів  $P2-Cu3$  (а: вихідних розчинів  та супернатантів ), отриманих при центрифугуванні сумішей відповідних концентрацій олігонуклеотидів з 3,25 нМ НЧЗ, після інкубації цих сумішей протягом 20 годин у воді при кімнатній температурі, від концентрації  $P2-Cu3$ ; залежність поверхневої густини іммобілізації  $P2-Cu3$  від їх концентрації при інкубації протягом 20 годин у воді при кімнатній температурі (б)

Ще одним фактором, що може впливати на ефективність іммобілізації  $P2-Cu3$  на поверхні НЧЗ є температура. Дійсно, якщо інкубація суміші 50 нМ  $P2-Cu3$  та 3,25 нМ НЧЗ в  $0,1 \times SSC$  буферному розчині при  $5^\circ C$  показує відносно повільну кінетику іммобілізації, то той же процес при кімнатній температурі відбувається так швидко, що всього за кілька хвилин ефективність іммобілізації  $P2-Cu3$  досягає понад 90% (рис 4.18).

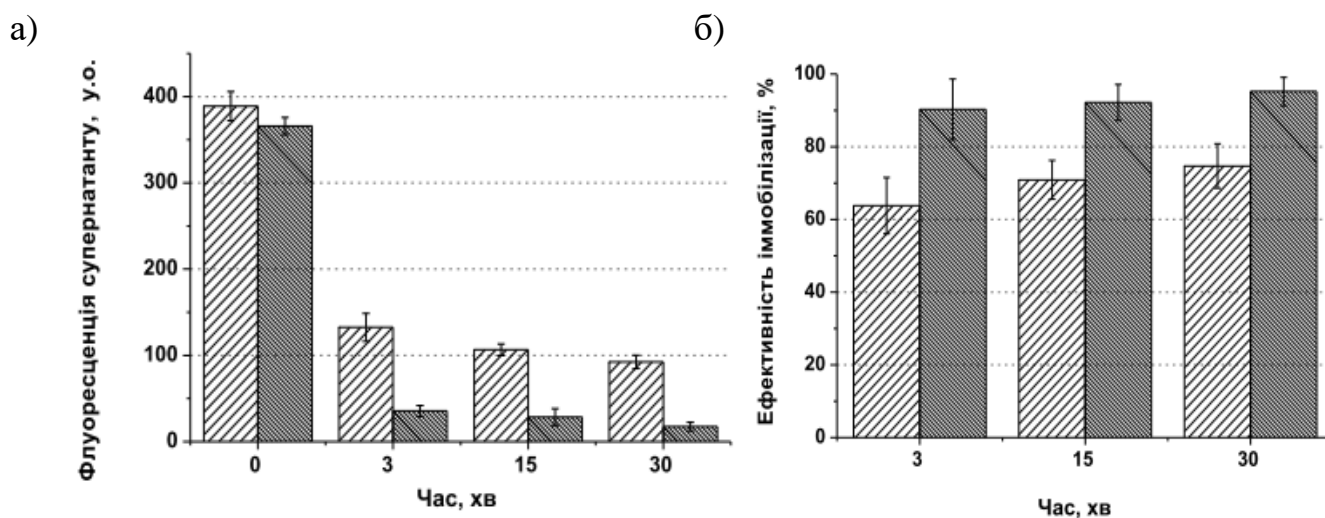
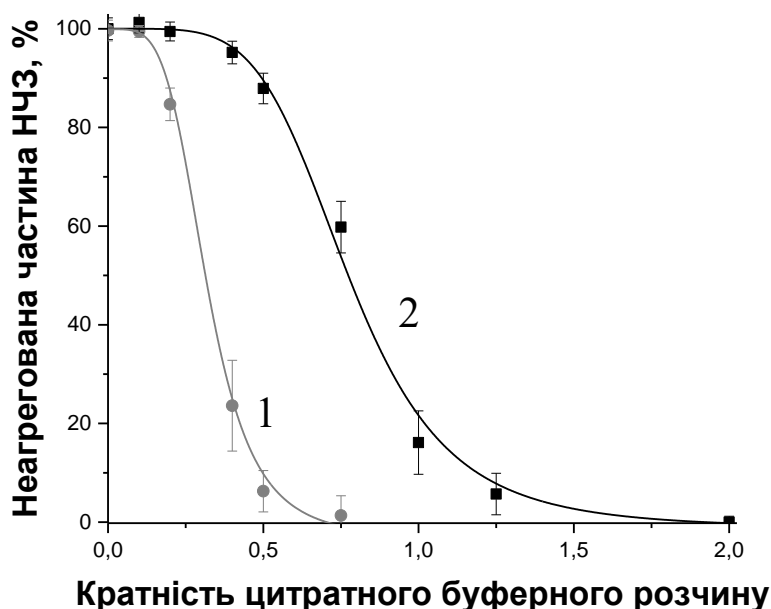


Рис. 4.18. Залежність рівня флуоресценції супернатантів, отриманих при центрифугуванні сумішей 50 нМ  $P2-Cu3$  з 3,25 нМ НЧЗ, після інкубації цих сумішей в розчині  $0,1 \times SSC$ , від температури (  $\text{▨}$  5°C  $\text{■}$  25°C ) і часу інкубації (а); залежність ефективності іммобілізації  $P2-Cu3$  від температури і часу інкубації (б)

Таким чином, можна констатувати, що запропонований експериментальний підхід дозволяє визначати рівень іммобілізації олігонуклеотидів на поверхні НЧЗ та досліджувати, як різні умови впливають на процес іммобілізації. Наші дослідження показали, що ефективність іммобілізації олігонуклеотидів на поверхні НЧЗ, стабілізованих цитрат-іонами, сильно залежить від іонної сили середовища і суттєво залежить від температури та часу іммобілізації. В той же час склад буферного розчину та його рН практично не впливали на процес іммобілізації олігонуклеотидів (принаймні в досліджуваному діапазоні їх концентрацій). Вихідні (немодифіковані) НЧЗ при концентрації  $KH_2PO_4$  вище 20 мМ демонструють схильність до агрегації. Тому початкове підвищення іонної сили середовища (від 0 до 15-20 мМ) викликає підвищення ефективності іммобілізації олігонуклеотидів, а подальше підвищення іонної сили супроводжується процесом агрегації наночастинок, що, очевидно, перешкоджає подальшій ефективній іммобілізації олігонуклеотидів. Щоб уникнути впливу процесу агрегації НЧЗ, можна проводити іммобілізацію олігонуклеотидів у водному середовищі. При цьому (для відносно невисоких концентрацій

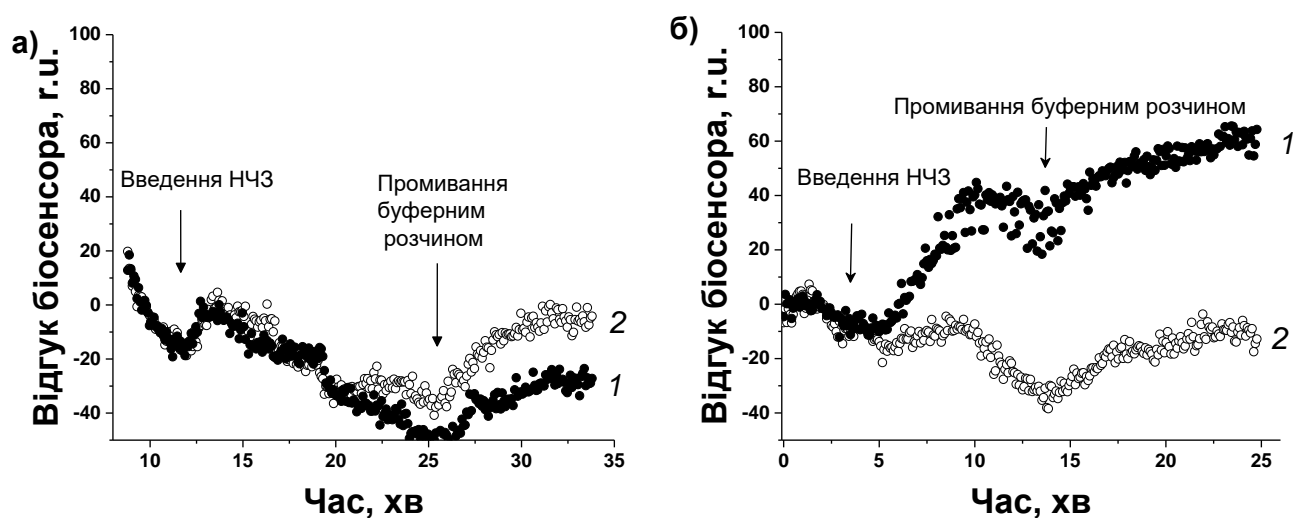
олігонуклеотидів) можна досягти близькі величини поверхневої густини іммобілізації  $P2-Cu_3$ , використовуючи більший період інкубації. З іншого боку НЧЗ, модифіковані олігонуклеотидами, мають бути більш стійкими до агрегації.

Щоб перевірити, наскільки модифіковані олігонуклеотидами НЧЗ є більш агрегаційно стабільними, провели наступне дослідження в буферному розчині SSC різної іонної сили (різної кратності). Вимірювання оптичного поглинання при 520 нм розчинів модифікованих і немодифікованих НЧЗ до та після їх інкубації у вказаних розчинах SSC дозволило визначити частку неагрегованих наночастинок (рис 4.19). Наведені графіки наочно демонструють те, що модифікація олігонуклеотидами підвищила агрегаційну стабільність НЧЗ. Для подальших досліджень можливості підсилення сигналу ППР доцільно використовувати буферні розчини до  $0,4 \times SSC$ .



**Рис. 4.19.** Відносна частка наночастинок, що не агрегувала після інкубації в буферному розчині SSC різної кратності протягом однієї години (1 – немодифіковані НЧЗ, 2 – НЧЗ модифіковані 12-14 ДНК/НЧ)

Отримані результати дозволили перейти до безпосереднього дослідження впливу модифікованих олігонуклеотидами НЧЗ на величину сенсорного відгуку ППР. Спочатку на золотій сенсорній поверхні спектрометра ППР іммобілізували тіольовані олігонуклеотиди *P2*, а потім для зменшення неспецифічної сорбції пасивували цю поверхню розчином МКГ. Розчини наночастинок, модифікованих комплементарними до *P2* тіольованими олігонуклеотидами *T2-18m* та некомплементарними *P2* (опис процесу приготування яких наведено в розділі 2.8), були розведені в буферних розчинах  $0,2 \times \text{SSC}$  та  $0,4 \times \text{SSC}$ . В буферному розчині  $0,4 \times \text{SSC}$  спостерігалась агрегація навіть при  $0,1 \text{ нМ}$  концентрації НЧЗ. Натомість, аналогічного ефекту в буферному розчині  $0,2 \times \text{SSC}$  не спостерігалось, тому саме в цьому буферному розчині можна було дослідити більш детально вплив концентрації НЧЗ в діапазоні від  $0,1$  до  $1 \text{ нМ}$  на відгук біосенсора. Спочатку, за допомогою методу ППР досліджували сенсорний відгук, який викликають НЧЗ, модифіковані некомплементарними тіольованими олігонуклеотидами. Починаючи з концентрації  $1 \text{ нМ}$  виникає неспецифічний сенсорний відгук, що погіршує можливості селективного підсилення (рис. 4.20).



**Рис. 4.20.** Відгук біосенсора (1 – робочий канал, 2 – контрольний канал) на інкубацію біоселективного елемента ППР з НЧЗ, модифікованими некомплементарними тіольованими олігонуклеотидами **P2**, з поверхневою густиною 12-14 олігонуклеотидів/НЧЗ при концентраціях розчину НЧЗ: а)  $0,5 \text{ нМ}$ , б)  $1 \text{ нМ}$

Якщо олігонуклеотиди, іммобілізовані на поверхні НЧЗ, і олігонуклеотиди, іммобілізовані на сенсорній поверхні, не були комплементарними, то різниці відгуків робочого та контрольного каналів практично не спостерігалось (рис. 4.21а). У випадку ж комплементарності олігонуклеотидів, іммобілізованих на поверхні НЧЗ, і олігонуклеотидів, іммобілізованих на сенсорній поверхні, спостерігали дуже великий сенсорний відгук (рис. 4.21б). Очевидно його викликав процес гібридизації відповідних олігонуклеотидів і накопичення НЧЗ біля сенсорної поверхні (в зоні чутливості сенсора ППР). Введення у вимірювальну комірку спектрометра ППР 0.5 нМ НЧЗ, модифікованих комплементарними олігонуклеотидами, привело до сенсорного відгуку понад 1000 г.у., в той час як введення тієї ж концентрації наночастинок, модифікованих некомплементарними олігонуклеотидами, не спричиняє перевищення рівня шуму (менше 10 г.у.), а введення аналогічної кількості комплементарних олігонуклеотидів (без НЧЗ) викликало відгук 23 г.у.

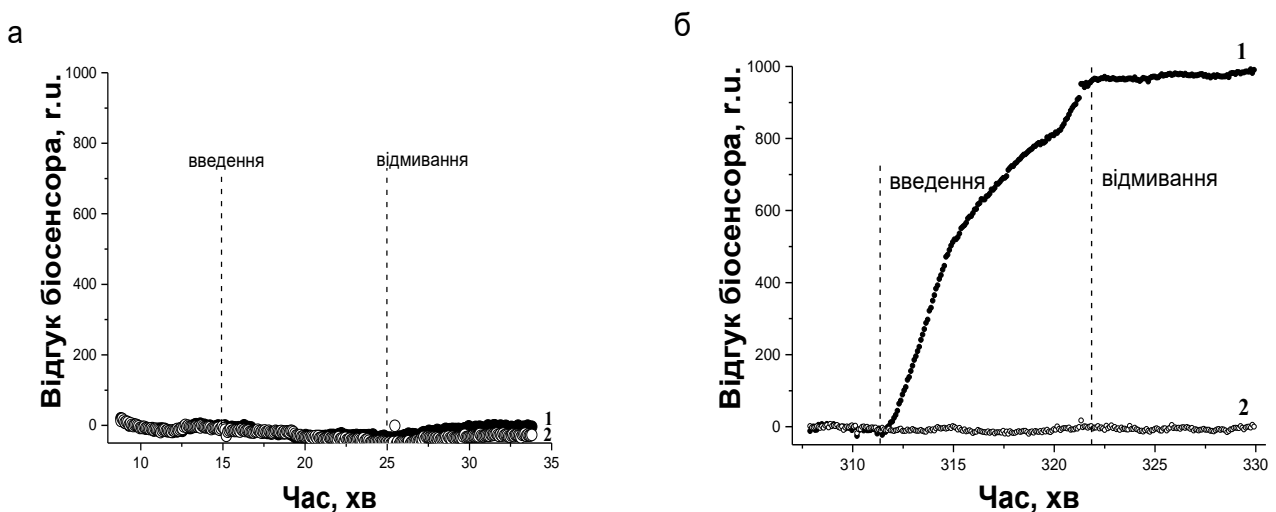


Рис. 4.21. Сенсограми ППР, які демонструють відгук біосенсора на внесення в робочий канал (1) НЧЗ, модифікованих олігонуклеотидами, некомплементарними (а) та комплементарними (б) до олігонуклеотидів, іммобілізованих на сенсорній поверхні. Через контрольний канал (2) здійснювалось прокачування буферного розчину

Необхідно відзначити, що 0,5 нМ НЧЗ модифіковані комплементарними олігонуклеотидами дають в три рази більший сигнал, ніж 400 нМ розчин комплементарних олігонуклеотидів, що відповідає насиченню відгука гібридизації. Цей сигнал є специфічним, він виникає тільки в випадку внесення наночастинок, модифікованих олігонуклеотидами, комплементарними до іммобілізованих олігонуклеотидів-проб. Даний метод підсилення має великий потенціал оптимізації і може забезпечити значне покращення межі детектування зразків ДНК.

Рис. 4.22 демонструє залежність відгуку сенсора від концентрації наночастинок, що використовували для підсилення сигналу гібридизації ДНК. Виникнення підсилення сенсорного відгуку можна спостерігати, починаючи з 50-пікомолярної концентрації НЧЗ.

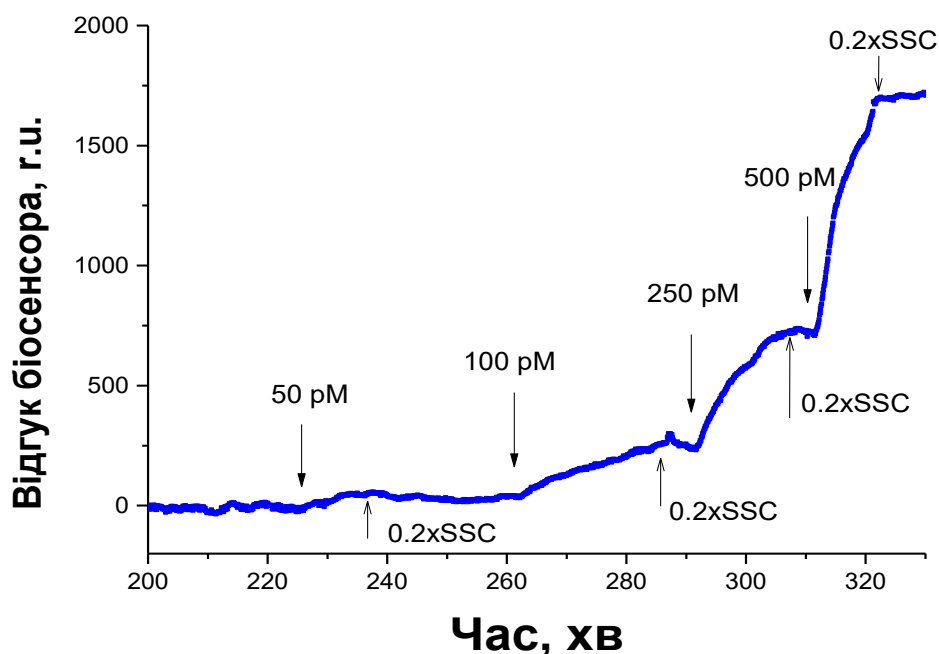


Рис. 4.22. Вплив концентрації НЧЗ, модифікованих олігонуклеотидами комплементарними до олігонуклеотидів, іммобілізованих на сенсорній поверхні, на відгук біосенсора при використанні НЧЗ для підсилення сигналу гібридизації ДНК



Використання даного методу для підсилення сигналу ППР дозволяє збільшити відгук сенсора в десятки і сотні разів завдяки зв'язуванню наночастинок з поверхнею, що в випадку використання «сандвіч аналізу» буде особливо корисно (формування комплексу ДНК-мішені з пробєю на сенсорній поверхні та іншою ДНК-пробєю на наночастиці, що підсилює сигнал).

#### 4.5. Висновки

В роботі вперше було розроблено біосенсор ППР для детектування мутацій в гібридному гені *bcr-abl*, цей біосенсор може забезпечити розпізнавання фрагмента послідовності гена без використання молекулярних міток.

Здійснено вибір нуклеотидної послідовності та довжини олігонуклеотиду-проби для селективного розпізнавання послідовності гібридного гена *bcr-abl*. Було проведено оптимізацію роботи чутливого елемента сенсора ППР шляхом пошуку оптимальної поверхневої густини ДНК-проб та іонної сили буферного розчину необхідної для дискримінації ДНК-мішеней.

Вперше було реалізовано концепцію термодискримінації послідовностей ДНК з використанням спектрометра ППР. Експериментальні дані підтвердили доцільність використання термодискримінації як відносно простого, надійного і передбачуваного методу розрізнення частково та повністю комплементарних олігонуклеотидів.

Для того, щоб реалізувати спосіб підсилення сигналу ППР через використання НЧЗ, модифікованих олігонуклеотидами-мішенями, було досліджено особливості агрегації таких НЧЗ в залежності від іонної сили буферного розчину. При низькій іонній силі буферного розчину спостерігається селективний, але невеликий за розміром сенсорний відгук. Застосування модифікованих НЧЗ дозволяє зберегти селективність сенсорного відгуку і набагато підвищити його значення. Запропонований метод дозволив отримати сенсорний відгук при концентрації олігонуклеотидів 1 нМ. Це більш ніж в 20 разів вище в порівнянні з границею визначення олігонуклеотидів (без використання НЧЗ). Таким чином, було досягнуто селективного підсилення сигналу гібридизації комплементарних олігонуклеотидів.

Результати цього розділу викладено у публікаціях:

- SPR Detection and Discrimination of the Oligonucleotides Related to the Normal and the Hybrid bcr-abl Genes by Two Stringency Control Strategies / M. J. Matsishin, I. V. Ushenin, A. E. Rachkov [et al.] // *Nanoscale research letters*. – 2016. – №11. – P. 11–19.
- Experimental approach using covalently attached fluorophore for quantification of oligonucleotide immobilization on gold nanoparticles / M. Matsishin, A. Rachkov, M. Losytskyu [et al.] // *Colloids Interface Sci. Commun.* – 2014. – №1. – P. 35–38
- Investigations of aggregation stability of gold nanoparticles at their interactions with compounds bearing thiol and / or amino functional groups. / A. Rachkov, M. Matsishin, V. Chegel [et al.] // *Chemical Sensors*. – 2014. – №4. – P. 8–13.
- Дослідження рівня іммобілізації олігонуклеотидів на поверхні наночастинок золота за допомогою експериментального підходу з використанням флуорофора Су3 / М. Мацишин, О. Рачков, А. Галушкіна [та ін.] // *Сенсорна електроніка та мікросистемні технології*. – 2014. – №11. – С. 31–41.
- SPR investigations of the formation of intermediate layer of the immunosensor bioselective element based on the recombinant Staphylococcal protein A / A. Rachkov, A. Bakhmachuk, M. Matsishin [et al.] // *Biopolymers and Cell*. – 2015. – №31. – P. 301–308.

## РОЗДІЛ 5

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

В даній роботі було розроблено наукові і технологічні підходи створення двох окремих ДНК-сенсорів, щоб забезпечити детектування мутацій, пов'язаних з Rh'-позитивною лейкемією та резистентними формами туберкульозу. Дані об'єкти дослідження було вибрано через те, що в Україні існує гостра потреба в сучасних, простих, швидких і надійних методах діагностики цих захворювань.

Офіційно епідемію туберкульозу в Україні Всесвітня організація охорони здоров'я оголосила у 1995 році [93]. Свого «піку» захворюваність на туберкульоз досягла у нашій країні у 2005 році, коли показник збільшився втричі порівняно з до епідемічним періодом (майже до 100 випадків на 100 тис. населення). У доповіді, представленій Всесвітньою організацією охорони здоров'я у 2014 році щодо глобальної боротьби з туберкульозом, Україна відноситься до групи країн з великим тягарем захворювання, що робить боротьбу з туберкульозом однією з головних задач для нашої держави.

Діагностика туберкульозу в Україні традиційно включає такі етапи: виявлення хворих, підтвердження діагнозу, в неоднозначних випадках проведення диференціальної діагностики. Для виявлення нових випадків туберкульозу використовують флюорографію органів грудної клітини. В випадках виявлення змін на флюорограмі пацієнтів направляють на дообстеження в протитуберкульозний заклад. Уточнення діагнозу морфологічних особливостей враження органів дихання здійснюють методом комп'ютерної томографії, ехографії плевральних порожнин і субплевально розташованих утворень в легенях [94].

Паралельна стратегія полягає в першочерговому виявленні хворих, що тривалий період (більше 2 тижнів) виділяють мокротиння: кислотостійкі палички

виявляють методом прямої бактеріоскопії мазка, зафарбованого по Цилю–Нильсену. [94]. Даний метод може знайти *M. tuberculosis* при наявності декількох сот тисяч бактерій в 1 мл досліджуваного матеріалу [95]. На жаль, за допомогою найбільш доступного методу вирощування культури бактерій в середовищі Левенштейна-Єнсена можливо виявити *M. tuberculosis* і визначити їх стійкість до антибіотиків лише впродовж 4-6 тижнів [96]. Пришвидшити аналіз можна за допомогою використання рідинного культурального середовища, такого як комерційно доступна система BacT/ALERT, але і в такому випадку результат отримують приблизно за 2 тижні [97].

Серед розробок останніх десятиліть важливу роль відіграють імуносенсиори для розпізнання збудників туберкульозу. Цей вид біосенсорів активно розвивається і широко представлений в літературі [98-101]. Існують навіть комерційно доступні імуносенсиори для розпізнання збудників туберкульозу, наприклад розроблені фірмою RapidBiosensor [102]. Вони здатні забезпечити розпізнання збудників туберкульозу концентрацією до 75 мікроорганізмів в 1 мл, результати отримані з їх допомогою добре корелюють з даними флюорографії та аналізу мокроти. Цей метод діагностування туберкульозу більш простий ніж аналіз продукту ПЛР але не може передбачити стійкість бактерії до антибіотиків.

Розшифровка повної послідовності генома *M. tuberculosis* і дослідження молекулярної генетичної основи стійкості до протитуберкульозних препаратів дозволили пов'язати мутації в гені *rpoB* зі стійкістю до рифампіцину, в гені *katG* зі стійкістю до ізоніазиду, в гені *pncA* зі стійкістю до піразинаміду тощо [103]. Це створює можливості для розробки сучасних, швидких молекулярних методів діагностики. До таких методів належить ПЛР, за допомогою якої можна виявити збудника при концентрації менше сотні мікроорганізмів в 1 мл досліджуваного матеріалу. Детектування *M. tuberculosis* цим методом здійснюють впродовж 5–6

годин. [104]. Крім того аналіз певних точкових мутацій в послідовностях вище згаданих генів дозволить діагностування стійкості бактерії до антибіотиків. До молекулярних методів, що здатні розпізнати мутації в продукті ПЛР належать і ті, що розроблено на основі гібридизаційних ДНК-сенсорів.

На сьогоднішній день існує великий інтерес до розробки електрохімічних ДНК-сенсорів і роботи на цю тему досліджують мутації багатьох генів, в тому числі і гена *rpoB* *M. tuberculosis*. Одна з таких робіт описує біосенсор здатний розпізнавати декілька точкових мутацій в гені *rpoB* за допомогою контролю окислення гуаніну методом диференційної імпульсної вольтамперометрії [105], важливим недоліком даного метода є одноразовість сенсора. Також існує декілька опублікованих робіт нашої групи присвячених пошуку мутацій в *rpoB* гені за допомогою метода ППР [60,89,106] та робота одного з наших закордонних партнерів, що поєднує методи ЕІС та ППР на пластинці одного чипа і забезпечує детектування 1мкМ концентрації повністю комплементарних ДНК-мішеней [75].

При виконанні даної роботи було вперше створено електрохімічний (імпедіометричний) ДНК-сенсор для визначення мутацій в гені *rpoB* *M. tuberculosis*. Була показана можливість детектувати специфічні послідовності ДНК в наномолярних концентраціях, без використання молекулярних міток, на основі простої, гнучкої технології планарних кондуктометричних перетворювачів, яка здатна забезпечити в майбутньому серійне виробництво, компактизацію та мініатюризацію біосенсорів.

За допомогою сервісу DINAMelt було проведено пошук оптимальної нуклеотидної послідовності та довжини проби для селективного розпізнавання комплементарних олігонуклеотидів.

Такою пробою був обраний олігонуклеотид ACC CAC AAG CGC CGA CTG TTG, який відповідає фрагменту гена *rpoB* *M. Tuberculosis* з міссенс мутацією в 531

кодони. Для ефективної іммобілізації на золотій сенсорній поверхні ця послідовність на 5'-кінці була модифікована SH-групою. Модифікована таким чином послідовність була названа P2.

Вибрано оптимальні робочі умови біосенсора:

- робочу напругу відносно референтного електрода (+240 мВ);
- концентрацію робочого буферного розчину (0,5×SSC);
- концентрацію електрохімічного маркера (1 мМ гексаціаноферату (II) калію та 1 мМ гексаціаноферату (III) калію);
- оптимальний діапазон робочих частот (низькочастотна половина півкола відповідає 0,1-10 Гц).

Побудовано еквівалентну схему комірки (відповідає еквівалентній схемі Рендлеса), що моделює динаміку електрохімічних процесів в ній. Продемонстровано можливість ДНК-сенсора визначати комплементарні олігонуклеотиди концентрацією 1 нМ та детектувати мутації в гені *rpoB M. tuberculosis*. Показано його високу селективність, чутливість і відтворюваність відгуку, що в подальшому дозволить діагностування стійких до рифампіцину форм туберкульозу. Ця робота має значний потенціал для розгортання подальших досліджень як в напрямку оптимізації і автоматизації техніки вимірювання, так і в напрямку визначення інших точкових мутацій та резистентності до багатьох протитуберкульозних препаратів.

Хронічна мієлоїдна лейкемія – один з найбільш поширених видів лейкемії. Захворюваність нею становить у середньому 3,3 випадки на 100 тис. населення. Близько 95% випадків цього захворювання супроводжується виникненням патогенного протеїну p210 BCR-ABL.

У хворих на ХМЛ поступово збільшується чисельність як зрілих елементів крові, так і кровотворних стовбурових клітин в кістковому мозку, що несуть Ph'-хромосому. Незважаючи на це, Ph'-негативні стовбурові клітини також присутні в

кістковому мозку, тобто Ph'-позитивні клони витісняють нормальні клітини крові, але зовсім їх не замінюють [107]. Цей факт дає можливість отримувати високу цитогенетичну ремісію у хворих на ХМЛ після проведення лікувальних заходів.

Діагностика лейкемії в повсякденній практиці базується на простих цитологічних критеріях (наприклад, ненормально високий рівень гранулоцитів), які доповнюють цитохімічними дослідженнями. Уточнення природи конкретного лейкемічного клону вимагає проведення імунофенотипування та цитогенетичного аналізу. Використання моноклональних антитіл, імунофлуоресцентних та імуноферментних методів дозволяє більш точно встановлювати конкретні форми та варіанти лейкемії. Хромосомні аномалії (транслокації, інверсії, делеції тощо) детектують шляхом диференційного забарвлення хромосом [20]. Все більше починають застосовувати молекулярно-біологічні методи виявлення гібридного гену *bcr-abl*, наприклад, полімеразну ланцюгову реакцію [22], флуоресцентну гібридизацію *in situ* (FISH) [108] тощо.

Для розпізнавання послідовності гібридного гену *bcr-abl* використовують і біосенсорні методи. Ці роботи базується на використанні диференціальної імпульсної вольтамперометрії [109-112]. При дослідження Ph-позитивної лейкемії використовували і спектроскопію ППР, але не для детектування мутацій гена *bcr-abl*, а для вивчення інгібування протеїнкіназ, пов'язаних з цим захворюванням [113,114].

В рамках виконання даної роботи вперше було розроблено біосенсор ППР, який може забезпечити розпізнавання послідовності гібридного гена *bcr-abl* в режимі реального часу і без використання молекулярних міток. За допомогою сервісу DINAMelt проведено пошук оптимальної нуклеотидної послідовності та довжини олігонуклеотиду-проби, яка б відповідала послідовності мРНК гібридного гену *bcr-abl* у місці стикування фрагментів двох нормальних генів *bcr* та *abl*. Було



обрано олігонуклеотид (GCT GAA GGG CTT TTG AAC TCT GCT), який після його модифікації SH-групою отримав назву *mod-Ph*.

Вперше було реалізовано концепцію термодискримінації послідовностей ДНК з використанням спектрометра ППР. Експериментально підтверджено доцільність використання термодискримінації як відносно простого, надійного і передбачуваного методу розрізнення частково та повністю комплементарних олігонуклеотидів. Даний метод є достатньо гнучким завдяки тому, що температуру в сенсорній комірці можна регулювати з точністю до 0,1 °C і температурний дрейф можна коригувати за допомогою контрольного каналу.

Для того, щоб реалізувати спосіб підсилення сигналу ППР через використання наночастинок золота, модифікованих олігонуклеотидами-мішенями, було досліджено особливості агрегації таких НЧЗ в залежності від іонної сили буферного розчину. При низькій іонній силі буферного розчину спостерігається помірний за розміром, селективний сенсорний відгук. Застосування модифікованих НЧЗ дозволяє зберегти селективність сенсорного відгуку і приблизно в 20 разів підвищити його величину. При селективній гібридизації проб, іммобілізованих на сенсорній поверхні, з комплементарними олігонуклеотидами, іммобілізованими на поверхні НЧЗ, запропонований метод дозволив досягти сенсорного відгуку понад 1000 г.у., в той час як введення такої ж концентрації наночастинок, модифікованих некомплементарними олігонуклеотидами, не спричиняє перевищення рівня шуму (менше 10 г.у.), а введення аналогічної кількості комплементарних олігонуклеотидів (без НЧЗ) викликало відгук 23 г.у.

Як вже було сказано, дослідження причин виникнення захворювань на молекулярному рівні створюють можливість для розробки сучасних молекулярно-біологічних та молекулярно-генетичних методів діагностування на їх ранніх стадіях. Серед таких молекулярних методів виявлення мутацій, як секвенування ДНК [115],

використання ДНК-мікрочипів [116] та молекулярних маячків [117] і гібридизаційних ДНК-сенсорів [118].

Біосенсорні методи аналізу є привабливими з економічної точки зору. Вони не вимагають дуже дорогого обладнання, великої кількості реактивів та витратних матеріалів. Вартість аналізу за допомогою гібридизаційних ДНК-сенсорів складається з трьох основних складових: вартості тіольованих ДНК-проб та інших реактивів, вартості золотого чипа і витратних матеріалів, вартості вимірювальної установки. Вартість синтезу проб невисока (фірма Sigma-Aldrich пропонує 10 нмолів 20-30-основних тіольованих ДНК-проб приблизно за 40\$), а їх витрати – дуже невеликі (10 нмолів ДНК-проб достатньо для створення більш ніж 50 біосенсорів). Витрати на всі інші реактиви разом, зазвичай, на порядок менші, ніж витрати на ДНК-проби. Витратні матеріали як для ЕІС, так і для ППР біосенсора – це, в основному, золоті чипи ціною від 1\$ до 5\$, а також інші матеріали, які є відчутно дешевшими. Вимірювальна установка – спектрометр ППР «Плазмон 6» є українською розробкою, її ціна в багато разів менша, ніж в її аналогів, а саме, приблизно 10000 \$, в той час як спектрометри «Biacore» коштують сотні тисяч доларів. Крім того, при розрахунках вартості аналізу треба враховувати, що спектрометр ППР може служити впродовж багатьох років. Установки для проведення вимірювань з допомогою ЕІС можуть коштувати близько 5000 \$ як «PalmSens 3» або близько 10000 \$ як «Voltalab 40», але в випадку подальшого створення кондуктометричного біосенсора, що працює на одній або декількох фіксованих частотах можна буде використовувати прилади, що коштують на порядки дешевше. Відповідно, створення біосенсора може коштувати близько 3 \$ - 10 \$ (без врахування ціни приладу) такий біосенсор здатний стабільно працювати і провести десятки і сотні вимірювань.

Швидкість проведення аналізу послідовності ДНК за допомогою гібридизаційних ДНК-сенсорів не лімітується швидкістю вимірювальних установок, а обмежується динамікою міжмолекулярних взаємодій. Процес гібридизації ДНК на сенсорній поверхні, зазвичай, виходить на насичення приблизно через 10 хвилин. Термодискримінацію олігонуклеотидів можна провести за 30-40 хв. Це робить даний метод і надійним, і відносно швидким.

Обидва біосенсори, що були розроблені в рамках даної роботи, працюють з короткими (21 і 24 основи) синтетичними послідовностями ДНК-проб. Вибір послідовності ДНК-проби та середовища гібридизації забезпечує селективність роботи біосенсора, і дозволяє досягти розпізнавання мутацій в послідовностях досліджуваних генів. Проби *P2* та *mod-Ph* були успішно використані разом з обома видами фізичних перетворювачів (імпедиметричним та оптичним), що дозволить в майбутньому вибирати з розроблених методів розпізнавання мутацій більш зручний з урахуванням тих чи інших критеріїв.

Сам по собі вибір фізичного перетворювача при розробці біосенсора також є дуже важливим етапом, який потім відобразиться на всіх його основних характеристиках. Тому треба чітко розуміти основні переваги і недоліки представлених в роботі двох видів фізичних перетворювачів.

Біосенсор на базі методу спектроскопії імпедансу має дві основні переваги над сенсором ППР: кращу границю визначення, яка становить 1 нМ комплементарної ДНК-мішені замість 20 нМ та можливість відчутного здешевлення і мініатюризації біосенсорної системи, при подальшій розробці кондуктометричного сенсора.

До недоліків цього біосенсорного методу належить складність обробки результатів біосенсорних вимірювань, що створює проблеми при роботі в реальному часі.

Біосенсор на базі методу ППР має три ключові переваги:

- він працює в режимі реального часу і може забезпечити аналіз динаміки асоціації і дисоціації комплексів;
- метод не потребує використання молекулярних міток, але дає можливість їх застосування для підвищення величини сенсорного відгуку;
- завдяки терморегулюючій комірці, що здатна керувати температурою з точністю до 0,1 °С, при підвищеній температурі можна забезпечити надійне розпізнавання мутацій в послідовності досліджуваних генів.

До недоліків методу ППР зазвичай відносять дещо гіршу границю визначення ДНК-мішеней, в порівнянні з електрохімічними сенсорами та флуоресцентними методами. Цей недолік можна компенсувати за рахунок додаткових методик підсилення сигналу, наприклад, з використанням НЧЗ.

Підсумовуючи, варто наголосити, що розроблені в даній роботі біосенсорні методи можуть не тільки розпізнавати специфічні послідовності нуклеїнових кислот, але і виявляти точкові мутації в досліджуваних генах. При діагностуванні туберкульозу такий підхід дозволить не тільки підтвердити наявність *M. tuberculosis* в досліджуваних зразках, але і визначити їх стійкість до протитуберкульозних препаратів. При діагностуванні ХМЛ надійне виявлення гібридного гену *bcr-abl*, що кодує патогенний протеїн p210 Bcr-Abl, стане запорукою успіху в лікуванні цього захворювання на ранніх стадіях. В зв'язку з тим, що на даний момент чутливість ДНК-сенсорів (їх границя детектування) ще не дозволяє проводити безпосередній аналіз мутацій у, наприклад, краплині біологічної рідини, розробка ДНК-сенсорів покликана доповнити і зробити більш надійним діагностування за допомогою ПЛР реакції. З іншого боку, подальше вдосконалення біосенсорних методів, активний пошук підходів підсилення специфічного сенсорного відгуку з використанням,

наприклад, досягнень нанотехнологій дають можливість сподіватися і на майбутнє пряме (без проміжної стадії ампліфікації) біосенсорне розпізнавання нуклеїнових кислот і аналіз їх мутацій.

Крім того необхідно відмітити, що використання біосенсорного підходу дає змогу створення мультибіосенсорів, які забезпечать в майбутньому детектування кількох основних мутацій, що лежать в основі резистентності *M. Tuberculosis* до відомих антибіотиків.

## ВИСНОВКИ

В даній роботі вперше було розроблено два ДНК-біосенсиори: на основі спектроскопії ППР для детектування наявності гібридного гену *bcr-abl* та електрохімічний (імпедіометричний) для виявлення мутації в гені *rpoB* *M. tuberculosis*, вперше створено їхні лабораторні макети та апробовано в модельних розчинах, досліджено варіанти покращення робочих характеристик.

1. За допомогою сервісу DINAMelt, враховуючи енергію внутрішньо- та міжмолекулярних взаємодій, було вибрано послідовності та довжину олігонуклеотидів-проб для ефективного розпізнавання ДНК-мішеней, що репрезентують гібридний ген *bcr-abl* та мутований ген *rpoB*.

2. Написано ряд комп'ютерних програм для розрахунку рівноважних констант зв'язування послідовностей ДНК в гетерогенних умовах, а також для швидкої та зручної обробки первинних даних, отриманих при використанні таких приладів, як «Nanodrop 2000», «Плазмон-6», «Voltalab», «Unico».

3. Вперше розроблено імпедіометричний ДНК-сенсор здатний визначати однонуклеотидну заміну в послідовності гена *rpoB* *M. tuberculosis* при 1 нМ концентрації досліджуваної ДНК-мішені.

4. Визначено умови роботи імпедіометричного ДНК-сенсора: робочу напругу відносно референтного електрода (+0,24 В), концентрацію буферного розчину (0,5×SSC), концентрацію електрохімічного маркера (суміш 1 мМ гексаціаноферату (II) калію та 1 мМ гексаціаноферату (III) калію), оптимальний діапазон робочих частот (0,1 Гц - 500 Гц).

5. Вперше розроблено біосенсор на основі спектроскопії ППР для детектування наявності гібридного гена *bcr-abl*, що може забезпечити

високоселективне, швидке і надійне розпізнавання відповідних послідовностей починаючи з 20 нМ концентрацій.

6. Проведено оптимізацію роботи чутливого елемента сенсора ППР шляхом пошуку оптимальної величини поверхневої густини олігонуклеотидів-проб (близько 112 нг/см<sup>2</sup>, що відповідає інкубації впродовж 1 години 1 мкМ розчину проби в 0,5 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>), іонної сили буферного розчину зручної для детектування мутацій в послідовностях ДНК-мішеней (відповідає іонній силі буферного розчину 0,5×SSC).

7. Вперше було реалізовано концепцію термодискримінації повністю та частково комплементарних олігонуклеотидів за допомогою геносенсора ППР з терморегульованою коміркою.

8. Розроблено методику кількісної оцінки рівня іммобілізації олігонуклеотидів на поверхні наночастинок золота для контролю їх взаємодії з біоселективним елементом геносенсора ППР. Реалізовано спосіб селективного підсилення відгуку ППР шляхом використання НЧЗ, модифікованих олігонуклеотидами-мішенями.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Kogan S. C. An Improved Method for Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases by Analysis of Amplified DNA Sequences / S. C. Kogan, M. Doherty, J. Gitschier // *The New England journal of medicine*. – 1987. – №16. – P. 985–990.
2. Feng P. Impact of molecular biology on the detection of foodborne pathogens / Peter Feng // *Molecular Biotechnology*. – 1997. – №7. – P. 267–278.
3. Rapid estimation of spoilage bacterial load in aerobically stored meat by a quantitative polymerase chain reaction / S. K. Venkitanarayanan, C. Faustman, J.F.Crivello [et al.] // *Journal of Applied Microbiology*. – 1997. – №82. – P. 359–364.
4. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens / J. E. Olsen, S. Aabo, W. Hill [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 1995. – №28. – P. 1–78.
5. Olsen J. E. Molecular methods for virus detection / J. E. Olsen, S. Aabo. – Royal Oak, Michigan: Academic Press, 1995. – 386 p. – *International Journal of Food Microbiology*. – 1.
6. Mifflin T. E. Recent developments in molecular diagnostic assays for genetic diseases / T. E. Mifflin // *Journal of Clinical Ligand Assay*. – 1996. – T. 19. – №. 1. – P. 27-42.
7. Ross D. Introduction to Molecular Medicine / D. Ross. – New York: Springer, 1996. – 177 p. – (2).
8. Carlos H. B. Microfabricated devices for genetic diagnostics / H. B. Carlos, A. M. Burns, T. D. Burke // *Proceedings of the IEEE*. – 1998. – №86. – P. 1769–1786.
9. Sassolas A. DNA biosensors and microarrays / A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier, L. J. Blum // *Chemical Reviews*. – 2008. – № 1. – P. 109–139.
10. Gold nanoparticle-based optical probes for sensing aminothiols / Q.Xiao, H. Gao, C. Lu, Q. Yuan // *TrAC Trends Analytical Chemistry*. – 2012. – №40. – P. 64–76.



11. Armes N. Revolutionary DNA Detection [Электронный ресурс] / Niall Armes – Режим доступа до ресурсу: <http://www.twistdx.co.uk/>.
12. OptiGene. Genie® III [Электронный ресурс] / OptiGene – Режим доступа до ресурсу: <http://www.optigene.co.uk/>.
13. Meridian Bioscience, Inc. illumigene® HSV 1&2 [Электронный ресурс] / Meridian Bioscience, Inc. – Режим доступа до ресурсу: <http://www.meridianbioscience.com>.
14. Nowell P. C. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes / P. C. Nowell, D. A. Hungerford // *Journal of the National Cancer Institute*. – 1960. – №25. – P. 85–109.
15. Rowley J. D. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining / Rowley // *Nature*. – 1973. – № 5405. – P. 290–293.
16. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia / C. R. Bartram, A. de Klein, A. Hagemeijer [et al.] // *Nature*. – 1983. – №5940. – P. 277–280.
17. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22 / J. Groffen, J. Stephenson, N. Heisterkamp [et al.] // *Cell*. – 1984. – №1. – P. 93–99.
18. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products / T. Lugo, A. Pendergast, A. Muller [et al.] // *Science*. – 1990. – №4946. – P. 1079–1082.
19. Daley G. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome / G. Daley, R. Van Etten, D. Baltimore // *Science*. – 1990. – №4944. – P. 824–830.
20. Rabbitts T. Chromosomal translocations in human cancer / T. Rabbitts // *Nature*. – 1994. – №6502. – P. 143–149.

21. Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis / E. M. Southern // *Journal of Molecular Biology*. – 1975. – №3. – P. 503–517.
22. Діагностика Ph' лейкозів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / Г. Д. Телегєєв, А. М. Дубровська, М. В. Дибков [та ін.] // *Гематологія та трансфузіологія*. – 2000. – №1. – С. 37–40.
23. Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript / C.M. Lucas, R.J. Harris, A. Giannoudis [et al.] // *Haematologica*. – 2009. – № 10. – P. 1362–1367.
24. Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation / J. Score, M.J. Calasanz, O. Ottman [et al.] // *Leukemia*. – 2010. – № 10. – P. 1742–1750.
25. Distinct characteristics of e13a2 versus e14a2 BCR-ABL1 driven chronic myeloid leukemia under first-line therapy with imatinib / B. Hanfstein, M. Lauseker, R. Hehlmann [et al.] // *Haematologica*. – 2014. – № 9. – P. 1441–1447.
26. A novel BCR-ABL fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia / A. Hochhaus, A. Reiter, H. Skladny [et al.] // *Blood*. – 1996. – №6. – P. 2236–2240.
27. A novel BCR-ABL transcript e2a2 in a chronic myelogenous leukaemia patient with a duplicated Ph-chromosome and monosomy 7 / E. Leibundgut, M. Jotterand, V. Rigamonti [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 1999. – №4. – P. 1041–1044.
28. Two patients with novel BCR/ABL fusion transcripts (e8/a2 and e13/a2) resulting from translocation breakpoints within BCR exons / G. F. How, L. C. Lim, S. Kulkarni [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 1999. – №2. – P. 434–436.
29. Long-term follow-up of a randomized trial comparing the combination of cyclophosphamide / M. Pilar Moreno, M. Noel Cortinas, R. Bonomi [et al.] // *Blood*. – 2015. – №11. – P. 3668–3670.

30. A novel BCR-ABL fusion gene (e2/1a) in a patient with Philadelphia-positive chronic myelogenous leukaemia and an aggressive clinical course / J. L. Byrne, G. I. Carter, J. M. Davies [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 1998. – №3. – P. 791–794.
31. A novel 203 kD aberrant BCR-ABL product in a girl with Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia / T. Llukai, K. Sugita, T. Suzuki [et al.] // *British Journal of Haematology*. – 1993. – №4. – P. 823–825.
32. Chereda B. Natural course and biology of CML / B. Chereda, J. Melo // *Annals of Hematology*. – 2015. – P. 107–121.
33. Raviglione M. Global tuberculosis report 2015 [Электронный ресурс] / Mario Raviglione // WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. – 2015. – Режим доступа до ресурсу: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf).
34. Heifets L. B. Drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*: a neglected problem at the turn of the century / L. B. Heifets, G. A. Cangelosi // *The international journal of tuberculosis and lung disease*. – 1999. – №7. – P. 564–581.
35. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy / D.A. Mitchison // *Tubercle*. – 1985. – № 3. – P. 219–225.
36. Ramaswamy S. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / S. Ramaswamy, J. M. Musser // *Tubercle and lung disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease*. – 1998. – №1. – P. 3–29.
37. Musser J. M. Antimicrobial agent resistance in mycobacteria: molecular genetic insights / J. M. Musser // *Clinical Microbiology Reviews*. – 1995. – № 4. – P. 496–514.
38. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis* / A. Telenti, P. Imboden, F. Marchesi [et al.] // *Lancet*. – 1993. – № 8846. – P. 647–651.

39. Molecular Mechanisms of Multiple Drug Resistance in Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* / S. Morris, G. H. Bai, P. Suffys [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1995. – № 4. – P. 954–960.
40. Gooding J. J. Electrochemical DNA Hybridization Biosensors / Justin J. Gooding // *Electroanalysis*. – 2002. – №17. – P. 1149–1156.
41. Using Self-Assembly To Control the Structure of DNA Monolayers on Gold: A Neutron Reflectivity Study / R. Levicky, T. Herne, M. J. Tarlov, [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 1998. – №38. – P. 9787–9792.
42. Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors / F. Lucarelli, G. Marrazza, A. Turner, [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2004. – №6. – P. 515–530.
43. Wang J. Electrochemical biosensors: towards point-of-care cancer diagnostics / Joseph Wang // *Biosensors & bioelectronics*. – 2006. – №21. – P. 1887–1892.
44. Teles F. Trends in DNA biosensors / F. Teles, L. Fonseca // *Talanta*. – 2008. – №77. – P. 606–623.
45. Use of a multi-thermal washer for DNA microarrays simplifies probe design and gives robust genotyping assays / J. Petersen, L. Poulsen, S. Petronis [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2008. – №2. – P. 1–10.
46. Multi-stringency wash of partially hybridized 60-mer probes reveals that the stringency along the probe decreases with distance from the microarray surface / L. Poulsen, M. J. Soe, D. Snakenborg [et al.] // *Nucleic Acids Research*. – 2008. – №20. – P. 1–14.
47. Homola J. Present and future of surface plasmon resonance biosensors / Jiri Homola // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2003. – №3. – P. 528–539.
48. Liedberg B. O. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing / B. O. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstrom // *Sensors and Actuators*. – 1983. – №4. – P. 299–304.

49. Liedberg B. Principles of biosensing with an extended coupling matrix and surface plasmon resonance / B. Liedberg, I. Lundström, E. Stenberg // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 1993. – №11. – P. 63–72.
50. Homola J. On the sensitivity of surface plasmon resonance sensors with spectral interrogation / J. Homola // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 1997. – №41. – P. 207–211.
51. Homola J. Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species / J. Homola // *Chemical reviews*. – 2008. – №108. – P. 462–493.
52. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: a review / X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova [et al.] // *Analytica chimica acta*. – 2008. – №620. – P. 8–26.
53. Анализ и численное моделирование ППР-спектров с механической разверткой по углу: алгоритм определения угловой позиции минимума / Ю. М. Ширлов, А. В. Самойлов, Р. В. Христосенко [и др.] // *Регистрация, хранение и обработка данных*. – 2004. – №3. – С. 3–18.
54. Šířová H. Surface plasmon resonance sensing of nucleic acids: A review / H. Šířová, J. Homola // *Analytica Chimica Acta*. – 2013. – №773. – P. 9–23.
55. Detection of oligonucleotide systematic mismatches with a surface plasmon resonance sensor / E. Milkani, S. Morais, C. R. Lambert [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2010. – №5. – P. 1217–1220.
56. Influence of point mutations on the flexibility of cytochrome b5: molecular dynamics simulations of holoproteins / Q. Cheng, D. R. Benson, M. Rivera, [et al.] // *Biopolymers*. – 2006. – №3. – P. 297–312.
57. Carrascosa L. G. Label-free detection of DNA mutations by SPR: application to the early detection of inherited breast cancer / L. G. Carrascosa, A. Calle,

L. M. Lechuga // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2009. – №4. – P. 1173–1182.

58. Fiber optic SPR biosensing of DNA hybridization and DNA–protein interactions / J. Pollet, F. Delport, K. P. Janssen [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2009. – №4. – P. 864–869.

59. Femtomol SPR detection of DNA–PNA hybridization with the assistance of DNA-guided polyaniline deposition / X. Su, H. F. Teh, K. M. Aung [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2008. – №11. – P. 1715–1720.

60. Development of Bioselective Element of SPR Spectrometer for Monitoring of Oligonucleotide Interactions and Comparison with Thermodynamic Calculations / A. Rachkov, Y. Holodova, Y. Ushenin [et al.] // *Sensor Letters*. – 2009. – №5. – P. 957–961.

61. Lisdat F. The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing / F. Lisdat, D. Schäfer // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2008. – №5. – P. 1555–1567.

62. Daniels J. S. Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges / J. S. Daniels, N. Pourmand // *Electroanalysis*. – 2007. – №12. – P. 1239–1257.

63. Macdonald D. D. Reflections on the history of electrochemical impedance spectroscopy / Digby D. Macdonald // *Electrochimica Acta*. – 2006. – №51. – P. 1376–1388.

64. Macdonald J. R. Applicability and power of complex nonlinear least squares for the analysis of impedance and admittance data / J. R. Macdonald, J.

Schoonman, A. P. Lehnen // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1982. – №131. – P. 77–95.

65. Orazem M. E. Critical issues associated with interpretation of impedance spectra / M. E. Orazem, P. Agarwal, L. H. Garcia-Rubio // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 1994. – №378. – P. 51–62.

66. Daniels J. S. Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges / J. S. Daniels, N. Pourmand // *Electroanalysis*. – 2007. – №12. – P. 1239–1257.

67. Bard A. J. Fundamentals and applications / A. J. Bard, L. R. Faulkner. – Austin: John Wiley & Sons, INC, 2001. – 814 p. – (Department of Chemistry Biochemistry University of Texas at Austin).

68. Stokers R. J. Fundamentals of Interfacial Engineering / R. J. Stokers, D. F. Evans. – New York, Chichester, Brisbane: Wiley-VCH. Inc, 1997. – 685 P.

69. Oldham K. B. A Gouy-Chapman-Stern model of the double layer at a (metal)/(ionic liquid) interface / Keith B. Oldham // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 2008. – №613. – P. 131–138.

70. Warburg E. Ueber das Verhalten sogenannter unpolarisierbarer Elektroden gegen Wechselstrom / E. Warburg // *Ann. der Phys. und Chemie*. – 1899. – № 3. – P. 493–499.

71. Pajkossy T. Impedance of rough capacitive electrodes / Tams Pajkossy // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. – 1994. – №364. – P. 111–125.

72. Biosensors. A quarter of a century of R&D experience / A. P. Soldatkin, S. V. Dzyadevych, Y. I. Korpan [et al.] // *Biopolymers and Cell*. – 2013. – №3. – P. 188–206.

73. Kinetic study of DNA/DNA hybridization with electrochemical impedance spectroscopy / D. Li, X. Zou, Q. Shen, [et al.] // *Electrochemistry Communications*. – 2007. – №2. – P. 191–196.
74. Label-free impedance detection of oligonucleotide hybridisation on interdigitated ultramicroelectrodes using electrochemical redox probes / V. Dharuman, T. Grunwald, E. Nebling [et al.] // *Biosensors & bioelectronics*. – 2005. – №4. – P. 645–654.
75. Combined surface plasmon resonance and impedance spectroscopy systems for biosensing / S. Patskovsky, V. Latendresse, A. Dallaire [et al.] // *The Analyst*. – 2014. – №3. – P. 596–602.
76. Turkevich J. A study of the nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold / J. Turkevich, P. Cooper, J. Hillier // *Discussions of the Faraday Society*. – 1951. – №55. – P. 55–75.
77. De Dios A. S. Multifunctional nanoparticles: analytical prospects / A. S. de Dios, M. Díaz-García // *Analytica chimica acta*. – 2010. – №666. – P. 1–22.
78. Gold Nanoparticles Aggregation: Drastic Effect of Cooperative Functionalities in a Single Molecular Conjugate / V. Chegel, O. Rachkov, A. Lopatynskyi [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2012. – №4. – P. 2683–2690.
79. A rational approach in probe design for nucleic acid-based biosensing / M. L. Ermini, S. Scarano, R. Bini [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2011. – №12. – P. 4785–4790.
80. O’Sullivan D. M. Analysis of *rpoB* and *pncA* mutations in the published literature: an insight into the role of oxidative stress in *Mycobacterium tuberculosis*



evolution? / D. M. O'Sullivan, T. D. McHugh, S. H. Gillespie // *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2005. – №5. – P. 674–679.

81. Markham N. R. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction / N. R. Markham, M. Zuker // *Nucleic Acids Research*. – 2005. – №33. – P. 577–581.

82. Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer / T. R. Hughes, M. Mao, A. R. Jones [et al.] // *Nature biotechnology*. – 2001. – №4. – P. 342–347.

83. Su X. Comparison of surface plasmon resonance spectroscopy and quartz crystal microbalance techniques for studying DNA assembly and hybridization / X. Su, Y. Wu, W. Knoll // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2005. – №5. – P. 719–726.

84. Tang Q. Surface plasmon resonance spectroscopy study of interfacial binding of thrombin to antithrombin DNA aptamers / Q. Tang, X. Su, K. Loh // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2007. – №315. – P. 99–106.

85. Herne T. Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces / T. Herne, M. Tarlov // *Journal of the American Chemical Society*. – 1997. – №13. – P. 8916–8920.

86. Peterson A. W. The effect of surface probe density on DNA hybridization / A. W. Peterson, R. J. Heaton, R. M. Georgiadis // *Nucleic acids research*. – 2001. – №24. – P. 5163–5168.

87. Quantitative analysis and characterization of DNA immobilized on gold / D. Petrovykh, H. Kimura-Suda, L. Whitman [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2003. – №17. – P. 5219–5226.

88. Katz E. Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric

Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors / E. Katz, I. Willner // *Electroanalysis*. – 2003. – №11. – P. 913–947.

89. Surface plasmon resonance detection of oligonucleotide sequences of the *rpoB* genes of *Mycobacterium tuberculosis* / A. Rachkov, S. Patskovsky, A. Soldatkin [et al.] // *Talanta*. – 2011. – №4. – P. 2094– 2099.

90. Zuker M. The DINAMelt Web Server [Електронний ресурс] / M. Zuker, N. Markham // College of Arts and Sciences, State University of New York at Albany. – 1995. – Режим доступу до ресурсу: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt>.

91. Mizrachi I. K. *Bioinformatics: Data, Sequence Analysis and Evolution* / I. K. Mizrachi, J. M. Keith. – London: Humana Press, 2008. – 562 p.

92. Optical properties of two interacting gold nanoparticles / W. Rechberger, A. Hohenau, A. Leitner [et al.] // *Optics Communications*. – 2003. – №3. – P. 137–141.

93. Александріна Т. А. Особливості епідемії туберкульозу в Україні / Т. А. Александріна // *Туберкульоз. Легеневі захворювання. ВІЛ-інфекція*. – 2012. – № 2.

– С. 7-13.

94. Борисов С. Е. Диагностика туберкулеза: возможности и пределы / С. Е. Борисов // *Пробл. туберкулёза*. – 2001. – №3. – С. 5–9.

95. Хоменко А. Г. *Руководство по внутренним болезням. Туберкулёз* / А. Г. Хоменко. – Москва: Медицина, 1996. – 496 с.

96. *Mycobacterium : General characteristics, isolation, and staining procedures* / [P. R. Murray, E. J. Baron, J. J. Jorgensen JH et al.]. – Washington, District of Columbia: *Manual of clinical microbiology*, 2003. – 559 p. – (8).

97. Comparison of two automated systems for the isolation of mycobacteria from clinical specimens / P.G. Flanagan, R. Williams, A. Paull [et al.] // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 1999. – № 12. – P. 912–914.
98. Rapid Diagnosis of M tuberculosis Using a Piezoelectric Immunosensor / F. HE, L. ZHANG [et al.] // *Anal. Sci.* – 2002. – № 4. – P. 397–401.
99. Immunosensor for Mycobacterium tuberculosis on screen-printed carbon electrodes / M. Díaz-González, M.B. González-García, A. Costa-García [et al.] // *Biosens. Bioelectron.* – 2005. – № 10. – P. 2035–2043.
100. A TSM immunosensor for detection of M tuberculosis with a new membrane material / F. He, L. Zhang, J. Zhao [et al.] // *Sensors Actuators B Chem.* – 2002. – № 3. – P. 284–290.      Ultrasensitive immunosensing of tuberculosis CFP-10 based on SPR spectroscopy / S.C. Hong // *Sensors Actuators B Chem.* – 2011. – № 1. – P. 271–275.103.
101. Development of immunosensor for express diagnosis of bovine tuberculosis / O.S. Oliynyk, E.M. Korzhov, A.A. Kaberniuk [et al.]// [edited by A.V.El'skaya, V.D.Pokhodenko] *Investigations of Sensor systems and Technologies — NASU, Kyiv: 2006. — C. 74-86.104.*
102. McCash E. TB Breathalyser - TB Breath Test [Электронный ресурс] / Elaine McCash – Режим доступа до ресурсу:<http://www.rapidbiosensor.com/tbbreathalyser.asp>
103. Wade M. M. Mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis / M. M. Wade, Y. Zhang // *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. – 2004. – №125. – P. 975 – 994.
104. Woods G. Molecular techniques in mycobacterial detection / G.L. Woods // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2001. – № 1. – P. 122–126
105. Direct electrochemical genosensing for multiple point mutation detection of Mycobacterium tuberculosis during the development of rifampin resistance / [P. Kara, C. Cavusoglu, S. Cavdar et al.] // *Biosens. Bioelectron.* – 2009. – № 6. – P. 1796–1800.

106. Discrimination of single base mismatched oligonucleotides related to the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* using a surface plasmon resonance biosensor / A. Rachkov, S. Patskovsky, A. Soldatkin [et al.] // *Biotechnol. Appl. Biochem.* – 2013. – № 4. – P. 453–458.

107. Collection of 'normal' blood repopulating cells during early hemopoietic recovery after intensive conventional chemotherapy in chronic myelogenous leukemia / A. M. Carella, M. Podesta, F. Frassoni [et al.] // *Bone marrow transplantation.* – 1993. – №12. – P. 267–271.

108. Detection of *bcr-abl* fusion in chronic myelogeneous leukemia by in situ hybridization / D. C. Tkachuk, C. A. Westbrook, M. Andreeff [et al.] // *Science.* – 1990. – №250. – P. 559–562.

109. Electrochemical DNA biosensor for the detection of short DNA species of Chronic Myelogenous Leukemia by using methylene blue / X.-H. Lin, P. Wu, W. Chen [et al.] // *Talanta.* – 2007. – № 2. – P. 468–471.

110. Electrochemical biosensor for detection of BCR/ABL fusion gene using locked nucleic acids on 4-aminobenzenesulfonic acid-modified glassy carbon electrode / J. Chen, J. Zhang, K. Wang [et al.] // *Anal Chem.* – 2008. – № 21. – P. 8028–8034.

111. A Sandwich-Type Electrochemical Biosensor for Detection of BCR/ABL Fusion Gene Using Locked Nucleic Acids on Gold Electrode / K. Wang, J. Chen, J. Chen [et al.] // *Electroanalysis.* – 2009. – № 10. – P. 1159–1166.

112. Graphene sheets, polyaniline and AuNPs based DNA sensor for electrochemical determination of BCR/ABL fusion gene with functional hairpin probe / L. Wang // *Biosens. Bioelectron.* – 2014. – P. 201–207.

113. Analysis of Imatinib and Sorafenib Binding to p38 $\alpha$  Compared with c-Abl and b-Raf Provides Structural Insights for Understanding the Selectivity of Inhibitors Targeting the DFG-Out Form of Protein Kinases / H. V. Namboodiri, M. Bukhtiyarova, J. Ramcharan [et al.] // *Biochemistry.* – 2010. – № 17. – P. 3611–3618.

114. Surface-plasmon-resonance-based biosensor with immobilized bisubstrate analog inhibitor for the determination of affinities of ATP- and protein-competitive ligands of cAMP-dependent protein kinase / K. Viht, S. Schweinsberg, M. Lust [et al.] // *Anal. Biochem.* – 2007. – № 2. – P. 268–277.

115. Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Sputa by Nested PCR-Linked Single-Strand Conformation Polymorphism and DNA Sequencing / B. J. Kim, K. H. Lee, B.N. Park [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – № 7. – P. 2610-2617.

116. Detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by using a specialized oligonucleotide microarray / J. Yue, W. Shi, J. Xie [et al.] // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* – 2004. – № 1. – P. 47–54.

117. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA / G. Leone [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – № 9. – P. 2150-2155.

118. DNA hybridization sensor based on aurothiomalate electroactive label on glassy carbon electrodes / A. de la Escosura-Muñiz, M.B. González-García, A. Costa-García [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics.* – 2007. – № 6. – P. 1048-1054.