

**Вольтамперометрический микросенсор
на основе золотых микроэлектродов,
модифицированных высокоспецифическим
аптамером, для определения тромбина**

М.С. Андрианова, О.В. Губанова, А.Е. Кузнецов

НПК «Технологический центр» (г. Москва)

**Voltammetric Microsensor Based
on Gold Microelectrodes Modified
With Highly Specific Aptamer for Thrombin Determination**

M.S. Andrianova, O.V. Gubanova, A.E. Kuznetsov

SMC «Technological Center», Moscow

Рассмотрен вольтамперометрический микросенсор на основе золотых микроэлектродов, модифицированных аптамером, для определения белка крови – тромбина. Исследованы поверхность золота и работоспособность системы микроэлектродов. Проведена химическая модификация поверхности золотого микроэлектрода аптамером. Предложен метод определения тромбина, основанный на изменении проводимости раствора электроактивного соединения.

Ключевые слова: золотой микроэлектрод; микросенсор; тромбин; электрохимические процессы.

The voltammetric microsensor based on a gold microelectrodes and an aptamer for determination of blood protein thrombin has been considered. The surface of the gold microelectrodes and the efficiency of the system have been studied. The chemical modification of the surface of a gold microelectrode with aptamers has been carried out. The thrombin determination method based on the change in the conductivity of the solution of the electroactive compound has been proposed.

Keywords: gold microelectrode; microsensor; thrombin; electrochemical processes.

Введение. Актуальным направлением в области разработки микросенсоров является определение наличия биомолекул в биологических жидкостях человека, таких как сыворотка и плазма крови. Как правило, диагностика биомолекул основана на межмолекулярных реакциях распознавания, которые отличаются высокой специфичностью и селективностью, например, взаимодействие антитело – антиген [1], биомолекула – аптамер [2].

Аптамеры – это небольшие цепи пептидов, РНК или одноцепочечной ДНК, способные связывать молекулы-мишени с высокой аффинностью. В результате формируются лабильные трехмерные структуры, образуются водородные, ионные или гидрофобные связи с мишенью [2]. В последние годы аналитические методы с использованием аптамеров широко применяются для определения белков [3, 4].

Выбор объекта исследования и преобразователя сигнала. При разработке электрохимического микросенсора в качестве мишени выбран белок крови – тромбин, который является маркером многих серьезных заболеваний [5], в качестве преобразователя сигнала – золотые микроэлектроды.

В работе применялась трехэлектродная схема подключения электродов: рабочий электрод (РЭ), на поверхности которого происходит электрохимическая реакция; электрод сравнения (ЭС), задающий опорный потенциал; вспомогательный электрод (ВЭ), через который проходит ток при протекании электрохимической реакции.

В качестве РЭ использовалась золотая проволока диаметром 30 мкм и длиной 300 мкм, в качестве ЭС и ВЭ – платиновая проволока диаметром 250 мкм и длиной 600 мкм.

Поверхность РЭ исследовалась с помощью зондового сканирующего микроскопа «Dimension ICON» (Bruker, США). Для получения изображений применялись зонды серии «RTESPA» (Bruker, США). Сканирование поверхности проводилось в режиме Tapping Mode, размер изображения 1×1 мкм (256 точек на линию). Для обработки изображений использовались встроенные функции NanoScope Analysis.

Поверхность РЭ типична для золота 99,99 % чистоты (SPM АМТЕК), полученного техникой плавления с последующим термоотжигом: зерненная структура со средним перепадом высот до 60 нм (рис.1,*а*), что можно видеть на профиле высот (рис.1,*б*), и со средней площадью зерна 8000 нм², которая оценивалась с помощью программного обеспечения NanoScope Analysis (рис.1,*б*). При этом поверхность электрода представляет собой чередование углублений и возвышений (максимум 186 нм) (см. рис.1,*а*). Такой РЭ имеет большую площадь поверхности, что определяет его высокую чувствительность.

В качестве метода анализа использовалась циклическая вольтамперометрия, подразумевающая наложение на электрохимическую ячейку треугольной развертки постоянного напряжения (–3 В; 3 В) и измерение тока как функции приложенного напряжения ($I = f(E_{\text{нал}})$).

Работоспособность созданной системы микроэлектродов (МЭ) исследовалась на примере электроактивного соединения $K_3Fe(CN)_6$, окисляющегося под действием тока до $K_4Fe(CN)_6$. Это соединение, в свою очередь, восстанавливается до исходного. На циклической вольтамперограмме этот процесс выглядит как кривая с пиком тока окисления (~1,6 В) и пиком тока восстановления (~0 В) (рис.2). Зависимости пиков тока окисления от концентрации исходного вещества аппроксимируются линейной функцией с высоким коэффициентом корреляции. Это свидетельствует о возможности проводить количественное определение содержания электроактивного соединения в растворе с использованием разработанных МЭ.

В ходе работы использовались растворы, содержащие $K_3Fe(CN)_6$ с концентрацией 3,22–11,76 мМ. Такой диапазон концентраций электроактивного вещества позволяет работать в определенном диапазоне тока РЭ. В данном случае ток окисления и восстановления на РЭ отличался от фона (буферный раствор). При этом ток не был слишком высоким и не происходило анодного растворения золотого электрода, целостность которого проверялась на оптическом микроскопе (Carl Zeiss Axio Imager.M2m).

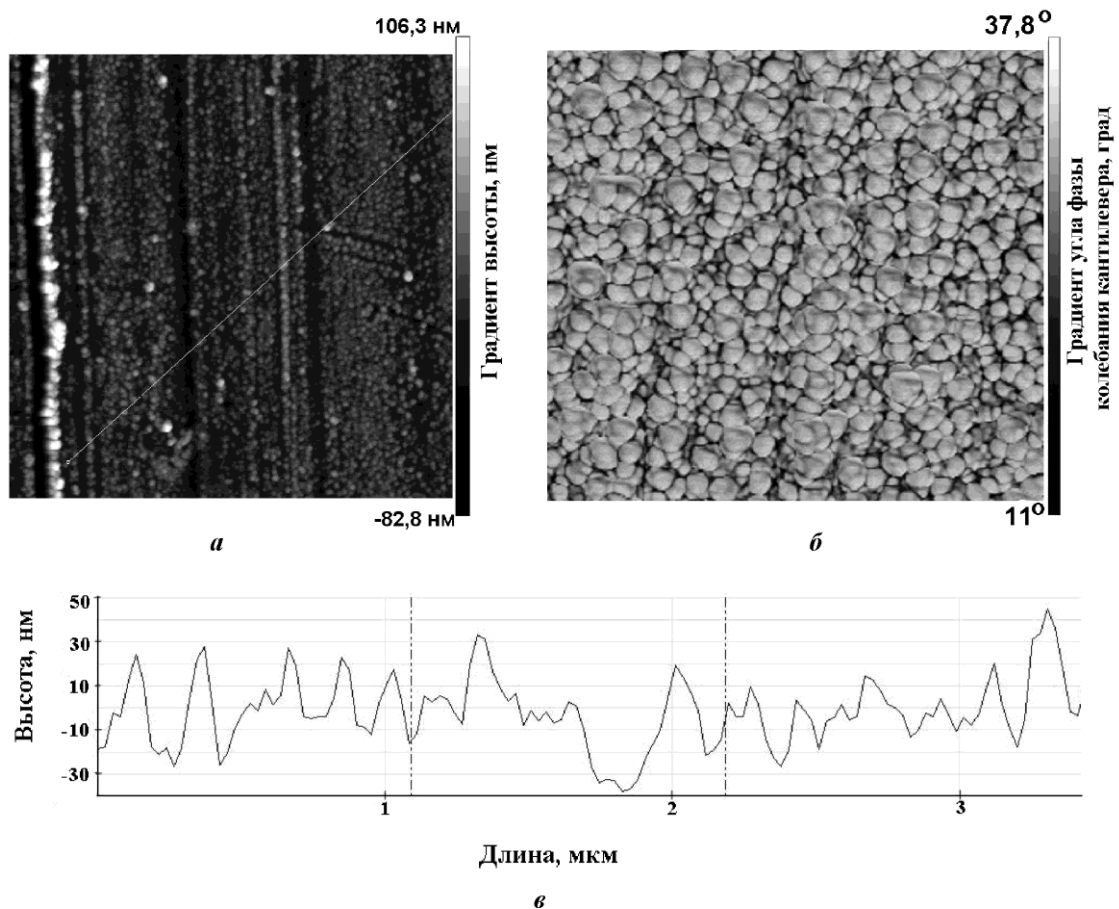


Рис.1. АСМ-изображение поверхности золота: *а* – изображение размером 5×5 мкм; *б* – изображение размером 1×1 мкм; *в* – профиль по высоте

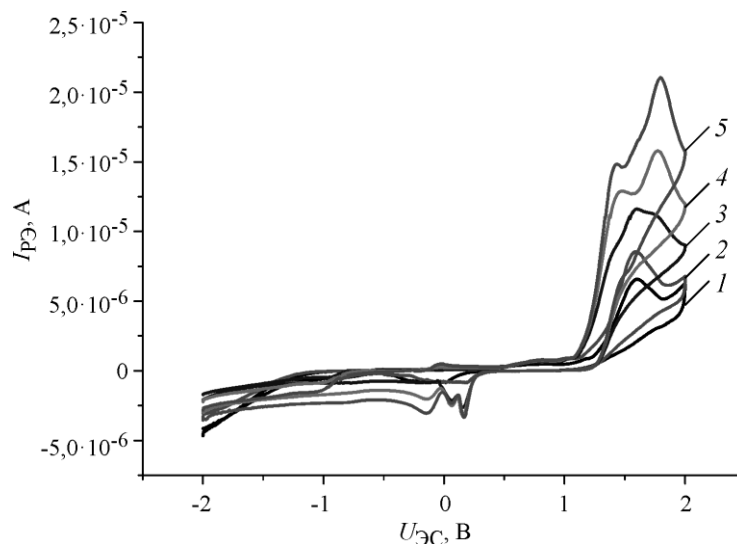


Рис.2. Циклические вольтамперограммы МЭ в буфере с добавлением $K_3Fe(CN)_6$:
1 – фон; 2 – 3,22 мМ; 3 – 6,25 мМ; 4 – 9,10 мМ; 5 – 11,76 мМ

Методика получения модифицированного золотого микроэлектрода. Для получения микросенсора на тромбин проводилась модификация поверхности РЭ. Определение тромбина проходило с использованием аптамера (АПТ)

5'-HS-C₆-TAAGTTCATCTCCCCGGTTGGTGTGGTTGGT-C₆-NH₂-3' [6]. Высокая специфичность данного аптамера по отношению к тромбину обусловлена низкой константой диссоциации комплекса аптамер–тромбин ($K_{\text{дисс}} = 45,4$ нМ для участка GGTTGGTGTGGTTGG, ответственного за связывание [7]) и, следовательно, высокой константой связывания.

Процедура модификации заключалась в нанесении на поверхность золота аптамера на тромбин с концевыми сульфгидрильными группами для закрепления молекулы на поверхности: $\text{Au} + \text{АПТ-SH} \rightarrow \text{Au-S-АПТ}$.

На первом этапе модификации поверхность золотого МЭ очищалась от внешних загрязнений с помощью ультразвуковой обработки в ацетоне в течение 15 мин [8]. Далее для лучшего сворачивания раствор АПТ (25 мкМ, 50 мМ Na₂HPO₄, pH 7,1) инкубировался при температуре 65 °С в течение 10 мин, затем температура снижалась до 25 °С со скоростью 5 °С/шаг и раствор выдерживали 1 мин на каждом шаге снижения температуры. Снятие защиты с SH-групп АПТ осуществлялось инкубацией в течение 1 ч (22 °С) с раствором AgNO₃ (0,2 М, 50 мМ Na₂HPO₄, pH 7,1): к 25 мкМ аптамера добавляли раствор нитрата серебра до концентрации 14 мМ. Далее АПТ инкубировался с раствором гидрохлорида Трис-(2-карбокситил)фосфина, препятствующим димеризации аптамеров за счет образования S–S-связей: к 10 мкл раствора, полученного на предыдущих этапах, добавлялось 4 мкл ТСЕР (10 мМ, 50 мМ Na₂HPO₄, pH 7,1), смесь инкубировалась в течение 1 ч при 22 °С. Полученный раствор разбавлялся буфером 50 мМ Na₂HPO₄ (до 1–2 мкМ), pH 7,1. В данном растворе проводилась модификация поверхности золотых МЭ в течение 12 ч [9].

Результаты и их обсуждение. Измерение тромбина подразумевает ковалентное присоединение бычьего сывороточного альбумина (0,1 мг/мл, 50 мМ Na₂HPO₄, pH 7,1) к АПТ через концевую NH₂-группу (в качестве спейсера использовался глутаровый альдегид (5 %, 50 мМ Na₂HPO₄, pH 7,1)). Это необходимо для создания стерических затруднений для диффузии соединений к поверхности электрода за счет объемного альбумина. Принцип формирования сигнала основан на изменении проводимости раствора электроактивного соединения K₃Fe(CN)₆ до и после добавления тромбина (рис.3). Изменение проводимости связано со стерическими затруднениями, которые возникали при диффузии Fe(CN)₆³⁻ к поверхности МЭ.

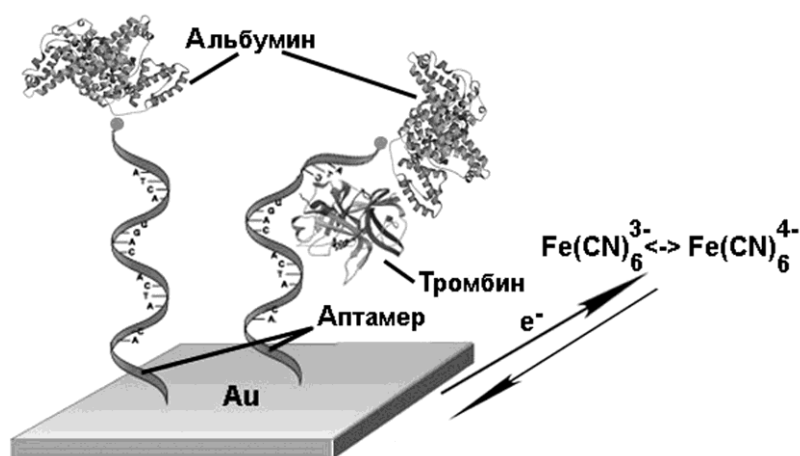


Рис.3. Схема определения тромбина с использованием АПТ, иммобилизованного на поверхности золотых микроэлектродов

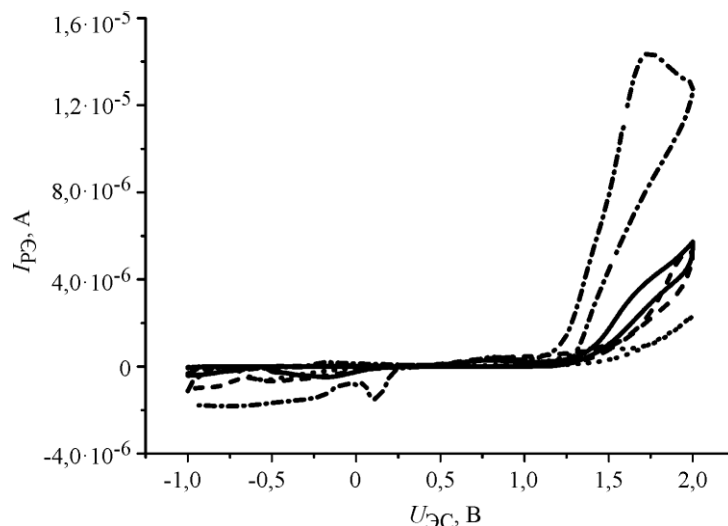


Рис.4. Циклические вольтамперограммы МЭ в фосфатно-солевом буфере до (· · · · буфер; - - - буфер + 6,25 мМ $K_3Fe(CN)_6$) и после (— буфер; - · - · буфер + 6,25 мМ $K_3Fe(CN)_6$) введения тромбина

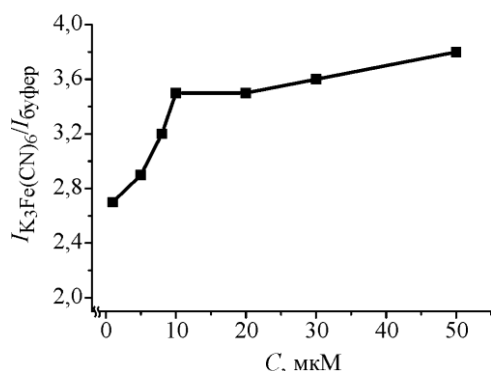


Рис.5. Зависимость сигнала $I_{K_3Fe(CN)_6} / I_{буфер}$ модифицированного золотого МЭ от концентрации C добавляемого тромбина

Сигнал МЭ на добавление тромбина показан на рис.4. Такая закономерность, по-видимому, объясняется образованием «компактных» комплексов аптамер (с альбумином) – тромбин, что способствует снятию диффузионных ограничений и улучшенному обмену электронами между электроактивным соединением $K_3Fe(CN)_6$ и поверхностью электрода.

Зависимость сигнала модифицированных МЭ от концентрации тромбина представлена на рис.5. В качестве сигнала использовалось отношение пиков тока окисления раствора $K_3Fe(CN)_6$ к пикам тока окисления раствора буфера без

$K_3Fe(CN)_6$ ($\sim 1,6$ В) после добавления различных концентраций тромбина ($I_{K_3Fe(CN)_6} / I_{буфер}$). Концентрационная зависимость представляет собой кривую с насыщением. Такая закономерность, вероятно, связана с различным расположением (стерическая составляющая) аптамеров и комплексов на их основе в приэлектродной области. Предел обнаружения тромбина составляет 5 мкМ.

Заключение. Предложенный новый метод определения тромбина с использованием золотых микроэлектродов прост в реализации. Для дальнейшего применения разработанного микросенсора наибольший интерес представляет область низких концентраций тромбина (< 10 мкМ). В связи с этим предполагается провести исследования по увеличению площади поверхности электродов, использованию других аптамеров, специфически связывающих тромбин, а также набора микроэлектродов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (проект № 16.535.2016/БЧ).

Литература

1. **Williams C. A., Chase M. W.** Antigen-antibody reactions in vivo: methods in immunology and immunochemistry // Academic Press. – 2014. – Vol. 5. – P. 177–183.
2. **Tombelli S., Mascini M.** Aptamers as molecular tools for bioanalytical methods // Current Opinion in Molecular Therapeutics. – 2009. – Vol. 11. – N. 2. – P. 179–188.
3. **Lu Y., Liu J.** Aptamer based colorimetric sensor systems : pat. 7892734 USA. – 2011.
4. **Tombelli S., Bini A., Minunni M., Mascini M.** Piezoelectric biosensors for aptamers-protein interaction // Biosensors and Biodetection. – 2009. – Vol. 504. – P. 23–36.
5. Early detection of thrombin activity in neuroinflammatory disease / **D. Davalos, K. M. Baeten, M. A. Whitney et al.** // Annals of neurology. – 2014. – Vol. 75. – N. 2. – P. 303–308.
6. **Xiao Y., Lubin A. A., Heeger A. J., Plaxco K. W.** Label-free electronic detection of thrombin in blood serum by using an aptamer-based sensor // Angewandte Chemie. – 2005. – Vol. 117. – N. 34. – P. 5592–5595.
7. **Goji S., Matsui J.** Direct detection of thrombin binding to 8-bromodeoxyguanosine-modified aptamer: Effects of modification on affinity and kinetics // J. of Nucleic Acids. – 2011. – Vol. 2011. – P. 5.
8. Impedimetric immunosensor based on SWCNT-COOH modified gold microelectrodes for label-free detection of deep venous thrombosis biomarker / **S. Bourigua, M. Hnaïen, F. Bessueille et al.** // Biosensors and Bioelectronics. – 2010. – Vol. 26. – N. 4. – P. 1278–1282.
9. **Xiao Y., Lai R. Y., Plaxco K. W.** Preparation of electrode-immobilized, redox-modified oligonucleotides for electrochemical DNA and aptamer-based sensing // Nature Protocols. – 2007. – Vol. 2. – N. 11. – P. 2875–2880.

Статья поступила
19 мая 2016 г.

Андреанова Мария Сергеевна – кандидат химических наук, научный сотрудник НИЛ интегральных биохимических наносенсоров НПК «Технологический центр» (г. Москва). *Область научных интересов:* биосенсоры, аналитические микро- и наносистемы. **E-mail:** smariika@mail.ru

Губанова Оксана Владимировна – младший научный сотрудник НИЛ проектирования элементной базы и технологических маршрутов НПК «Технологический центр» (г. Москва). *Область научных интересов:* технология микро- и нанoeлектроники, математическое моделирование полупроводниковых устройств.

Кузнецов Александр Евгеньевич – начальник лаборатории НИЛ интегральных биохимических наносенсоров НПК «Технологический центр» (г. Москва). *Область научных интересов:* аналитические микро- и наносистемы.