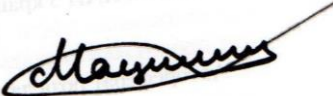


**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОЛОГІЇ І ГЕНЕТИКИ**

МАЦИШИН МИКОЛА ЙОСИПОВИЧ


МАЦИШИН

УДК 575.224.22

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

03.00.20 – біотехнологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ – 2016

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в лабораторії біомолекулярної електроніки відділу механізмів трансляції генетичної інформації Інституту молекулярної біології і генетики НАН України та на кафедрі молекулярної біотехнології та біоінформатики Інституту високих технологій Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор, член-кореспондент НАН України **Солдаткін Олексій Петрович**
Інститут молекулярної біології і генетики НАН України,
завідувач лабораторії біомолекулярної електроніки.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник, член-кореспондент НАН України
Федір Іванович Товкач
Інститут мікробіології і вірусології
імені Д.К. Заболотного НАН України,
завідувач відділу молекулярної генетики бактеріофагів

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Макогоненко Євген Митрофанович
Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України
головний науковий співробітник.

Захист відбудеться «25» жовтня 2016 р. о 10³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.237.01 Інституту молекулярної біології і генетики НАН України за адресою: 03680, м. Київ, вул. Заболотного, 150.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту молекулярної біології і генетики НАН України (03680, м.Київ-680, вул. Академіка Заболотного, 150).

Автореферат розісланий “___” вересня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук,
старший науковий співробітник



Крупська І.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 односторонніми 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 Ph'-позитивною лейкемією, та імпедиметричного 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') 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'-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 *rpoB 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», «Voltalab», «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 *rpoB 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 СуЗ, на поверхні наночастинок золота (Патент України на корисну модель № 93555).

Вперше було досягнуто селективне 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 імпедіметричного 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 імпедіметричного 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. Мамікіним, 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-й 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Матеріали. 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-(CH₂)₆-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 *Bcrex14* (CCA CTG GAT TTA AGC AGA GTT CAA), який є фрагментом нормального гена *bcr*; та частково комплементарний до *mod-Ph* олігонуклеотид *BA190* (ATG GAG ACG CAG AAG CCC TTC AGC), який є фрагментом нормального гена *abl*. Також використовували одноланцюгові олігодезоксирибонуклеотиди, синтезовані IBA GmbH (Німеччина): модифікований на 5'-кінці SH-групою для іммобілізації на золотій сенсорній поверхні *P2* (HS-(CH₂)₆-ACC CAC AAG CGC CGA CTG TTG), що відповідає фрагменту гена *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 *rpoB* з мутацією в 531 кодоні; *T2-18m* (HS-(CH₂)₆-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 нуклеотиди 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 *rpoB M. tuberculosis*; *TC* (GCT ATC AGC CAC GAA CAC CCA), що є випадковою, некомплементарною до *P2* послідовністю.

Крім олігонуклеотидів в роботі були використані такі реактиви: гексаціаноферат (II) калію тригідрат та гексаціаноферат (III) калію та SSC буфер 20 кратної концентрації (300 мМ цитрат натрію, 3 М хлорид натрію, рН 7) отримані з «Sigma-Aldrich» (Франція); одноосновний фосфат калію та б-меркапто-1-гексанол (MCH) отриманий від «Fluka» (Швейцарія); двоосновний фосфат натрію виробництва «Merck» (Німеччина). Всі розчини були приготовлені з використанням деіонізованої

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.».

Типи перетворювачів, використаних в роботі. Кремнієві пластинки з золотим покриттям площею $0,19 \text{ см}^2$, створені Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes (LAAS), CNRS Тулуза, було використано як робочі електроди для ЕІС. Електроди були виготовлені шляхом вакуумного напилення шару золота товщиною 300 нм на адгезійний шар титану (30 нм), нанесений на кремнієву підкладку.

Чип ППР, розроблений в Інституті фізики напівпровідників НАН України ім. В.Є. Лашкарьова, являє собою плоскопаралельну пластинку, виготовлену з того ж скла, що і призма спектрометра ППР, на поверхню якого вакуумним напиленням був нанесений 1-2-нанометровий шар хрому для покращення адгезії, а на нього 50-нанометровий шар золота.

Створення біоселективного елементу. Безпосередньо перед вимірюванням робочий електрод промивали свіжим розчином «піранья» (суміш трьох об'ємів концентрованої H_2SO_4 та одного об'єму 30% H_2O_2) протягом 10 хвилин, після чого його поверхню була ретельно промита Milli-Q водою.

Імобілізацію одноланцюгових олігонуклеотидів-проб на поверхні очищеного робочого електрода (створення біоселективного елементу) проводили інкубацією 1 мкМ розчину олігонуклеотидів у 0,5 М KH_2PO_4 (рН 4,0) протягом однієї години. Для пасивації поверхні електрода використовували 200 мкМ МСН в 0,5 М KH_2PO_4 (рН 4,0). Після завершення формування біоселективного елементу його поверхню обробляли 8 М сечовиною протягом 3 хвилин з подальшим п'ятикратним промиванням буферним розчином для гібридизації, а саме SSC буферним розчином необхідної кратності ($2 \times \text{SSC}$ містить 30 мМ цитрат натрію та 300 мМ NaCl , рН 7,0). Для регенерації біоселективного шару використовували 8 М сечовину, після чого здійснювали п'ятикратну промивку комірки буферним розчином для гібридизації.

Методика проведення електрохімічних вимірювань. Вимірювальним приладом в даній системі слугувала багатофункціональна електрохімічна система VoltaLab 40 (PGZ 301) з пакетом програмного забезпечення VoltaMaster4 (Radiometer Analytical, Франція). Робочий електрод приєднували до вимірювального приладу і фіксували в робочій комірці. Експерименти по дослідженню ДНК-сенсора виконували, прикладаючи змінну напругу 10 мВ, в діапазоні частот 0,1 – 100 000 Гц за температури 22 °С. Золоту пластинку з іммобілізованими одноланцюговими олігонуклеотидами-пробами (робочий електрод) розташовували на нижній частині комірки (рис. 1). Площа активної частини електрода обмежується гумовою прокладкою і складає приблизно 40 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 хлор-срібний електрод.

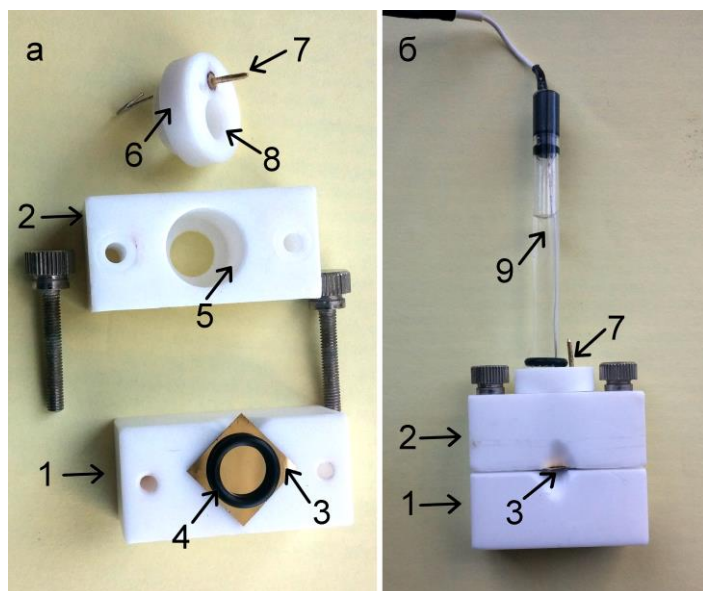


Рис. 1. Компоненти вимірювальної комірки (а) та зібрана комірка (б) для електрохімічних досліджень. 1 – нижня частина комірки; 2 – центральна частина комірки; 3 – робочий електрод; 4 – гумова прокладка; 5 – циліндрична порожнина для розчину; 6 – кришка; 7 – вбудований допоміжний електрод; 8 – отвір для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

Методика проведення вимірювань з використанням спектрометра ППР. Перед роботою зі спектрометром ППР «Плазмон 6» (рис. 2) необхідно очистити чип щойно приготовленим розчином «піраньї» впродовж 2 хв за кімнатної температури. Після чого чип багатократно промивають Milli-Q водою і висушують.

Перед установкою чипа на призму спектрометра його скляну поверхню змочують імерсійною рідиною і обережно кладуть скляною гранню на поверхню призми, а на протилежній грані, вкритій шаром золота, розміщують форму з силіконової гуми, що утворює бічні стінки вимірювальної комірки. Зверху накривають кришкою комірки, яка фіксується спеціальним механізмом.

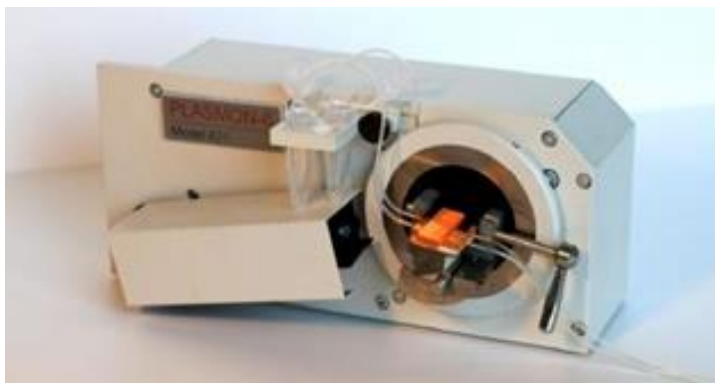


Рис. 2. Зовнішній вигляд спектрометра ППР «Плазмон-6»

Досліджуваний розчин подають у вимірювальну комірку перистальтичним насосом «Ismatec» за допомогою полімерних трубок. Даний прилад може вимірювати криву ППР кожні 10 сек., а комп'ютер будує відповідну сенсограму, що відслідковує стан поверхні і взаємодію досліджуваних компонентів.

Метод синтезу наночастинок золота. НЧЗ були отримані відновленням золота з окисненого стану у складі тетрахлораурат-іонів (AuCl_4^-) цитратом натрію у водному розчині за температури кипіння. 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 ~ 520 нм. За умови, що всі іони золота були

хімічно відновлені і увійшли до складу наночастинок, середній діаметр останніх складав 13 нм, а концентрація отриманого препарату НЧЗ - 13 нМ.

Програмне забезпечення, розроблене і використане в роботі. Під час виконання роботи було написано ряд програм для підвищення ефективності роботи з файлами приладів «Voltalab», «Nanodrop2000», «Плазмон б», «Unico», візуалізації та інтерпретації даних отриманих з їх допомогою. Крім того, в роботі було використано комерційну програму ZFit для детального аналізу спектрів імпедансу і визначення характеристик елементів еквівалентного кола.

Розробка імпедіметричного геносенсора для виявлення мутацій в гені *rpoB* *M. tuberculosis*

Розповсюдження резистентних форм туберкульозу є однією з головних проблем боротьби з цим захворюванням на сьогодні. Можливості лікування резистентних форм туберкульозу 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.

Розшифровка повної послідовності генома *M. tuberculosis* і дослідження молекулярно-генетичних основ 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 (Wade et al., 2004). Це створює можливості для розробки сучасних, швидких молекулярних методів діагностики. До таких методів належить ПЛР, за допомогою якої можна виявити збудника при концентрації лише декількох сотень мікроорганізмів в 1 мл досліджуваного матеріалу. Детектування *M. tuberculosis* цим методом здійснюють впродовж 5–6 годин (Woods et al., 2001). Крім того аналіз певних точкових мутацій в послідовностях вище згаданих генів дозволить діагностування стійкості бактерії до антибіотиків. До молекулярних методів, що здатні розпізнавати мутації в продукті ПЛР належать і ті, що розроблено на основі гібридизаційних ДНК-сенсорів.

При розробці афінних біосенсорів використовується розпізнавання первинної структури ДНК на основі явища гібридизації. Гібридизаційний ДНК-сенсор складається з фізичного перетворювача та іммобілізованих на його поверхні односторонніх олігонуклеотидів-проб. Внаслідок процесу гібридизації фізичний перетворювач формує сенсорний сигнал, який можна обробити і проаналізувати.

За допомогою сервісу DINAMelt було проведено пошук оптимальної нуклеотидної послідовності та довжини олігонуклеотида-проби для селективного розпізнавання комплементарних послідовностей ДНК. Такою пробною була обрана олігонуклеотид ACC SAC AAG CGC CGA CTG TTG, який відповідає фрагменту гена *rpoB* *M. tuberculosis* з міссенс мутацією в 531 кодоні (TCG → TTG). Для ефективної іммобілізації на золотій сенсорній поверхні ця послідовність на 5'-кінці була модифікована SH-групою. Модифікована таким чином послідовність була названа P2.

Щоб запобігти неспецифічному зв'язуванню ДНК з сенсорною поверхнею, остання була модифікована меркаптогексанолом (рис. 3б). Ця процедура не тільки блокує вільні сайти на золотій поверхні, а й сприяє експонуванню змістових послідовностей проб в розчин для ефективної гібридизації з ДНК-мішенями (рис. 3в).

Для забезпечення ефективної роботи електрохімічного біосенсора було необхідно визначити низку параметрів його функціонування та здійснити відбір перетворювачів. Внаслідок оптимізації біосенсора за багатьма параметрами визначили його оптимальну конфігурацію та робочі умови. Внаслідок проведення експериментальної перевірки було обрано суцільний планарний золотий електрод як найбільш чутливий перетворювач, а суміш 1 мМ розчинів гексоціанофератів II/III як оптимальну концентрацію електрохімічного маркера. Крім того, основним робочим діапазоном частот було обрано діапазон 0,1-500 Гц, а робочим потенціалом - +0,24 В при амплітуді змінної напруги 10 мВ.

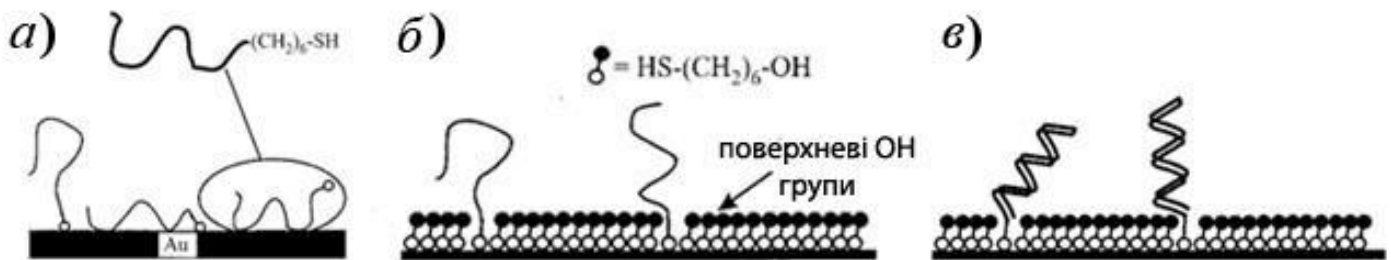


Рис. 3. Стадії формування біоселективного шару на золотій сенсорній поверхні: а) іммобілізація ДНК-проб, б) блокування вільних сайтів 6-меркапто-1-гексанолом, в) гібридизація ДНК-мішені

Для моделювання спектрів імпедансу була застосована еквівалентна схема Рендлеса (рис. 4 а), яка складається з об'ємного опору електроліту (R_e), поверхневого опору (R_f), елемента Варбурга (Z_w), що відповідає дифузії іонів з об'єму до поверхні, та поверхневої ємності, що являє собою неідеальний конденсатор, представлений елементом постійної фази (CPE).

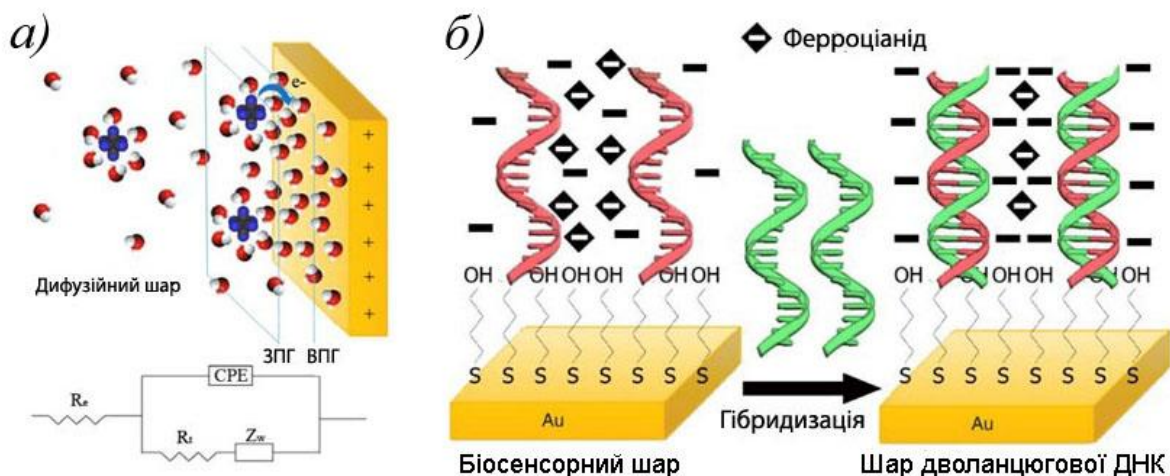


Рис. 4. Структура подвійного шару на поверхні робочого електрода (а) та еквівалентна схема, що їй відповідає, та будова шару іммобілізованого матеріалу (б) на поверхні робочого електрода до і після гібридизації з комплементарними послідовностями

Рис. 46 демонструє механізм детектування процесу гібридизації в присутності гексаціанофератів. Цей процес супроводжується появою біля поверхні робочого електрода додаткових негативних зарядів фосфатних залишків 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.

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).

Для аналізу даних ЕІС спектри імпедансу апроксимували еквівалентною схемою Рендлеса за допомогою програми ZFit. Було показано добре співпадіння теоретично розрахованих кривих та експериментальних спектрів для всіх трьох станів електрода (до іммобілізації олігонуклеотидів-проб, після їх іммобілізації та при їх гібридизації з комплементарними олігонуклеотидами-мішенями). При гібридизації відчутно збільшується опір переносу заряду (R_t) за відносно незначного зсуву характеристик СРЕ елемента (табл. 1). Відповідно, по зміні R_t можна відслідковувати процес гібридизації (на діаграмі Найквіста R_t приблизно відповідає діаметру імпедансного «півкола»).

Таблиця 1

Характеристики елементів еквівалентної схеми Рендлеса немодифікованого електрода (а), модифікованого P2 і MCH (б) та після гібридизації P2-T2 (в)

	а	б	в
R_e	$7 \pm 6 \text{ Ом}$	$7 \pm 1 \text{ Ом}$	$3 \pm 1 \text{ Ом}$
Q_{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_{CPE}	$0,397 \pm 0,515$	$0,965 \pm 0,509$	$0,955 \pm 0,507$
R_t	$546 \pm 32 \text{ Ом}$	$2128 \pm 3 \text{ Ом}$	$2403 \pm 2 \text{ Ом}$
σ_w	$861 \pm 68 \text{ Ом} \cdot \text{с}^{-1/2}$	$553 \pm 1 \text{ Ом} \cdot \text{с}^{-1/2}$	$751 \pm 2 \text{ Ом} \cdot \text{с}^{-1/2}$

Після формування біоселективного елемента на поверхні робочого електрода було досліджено стабільність імпедансу системи та відгук сенсора на гібридизацію повністю комплементарного олігонуклеотида-мішені T2 з іммобілізованим олігонуклеотидом-пробою P2 (рис. 5а). Зафіксовано динаміку гібридизації за допомогою спектрів ЕІС та показано вихід на насичення відгуку біосенсора впродовж 20 хв.

Проведення регенерації сенсорної поверхні за допомогою 8М розчину сечовини руйнує дуплекси P2-T2 і в ході подальшого промивання вимірювальної комірки видаляє олігонуклеотида T2, що зменшує імпеданс системи і відтворює його початкове значення. Вигляд кривої Найквіста після кожного з трьох циклів гібридизації і регенерації продемонстровано на (рис. 5б). Крива добре відтворюється, реальна компонента опору варіюється в межах 2%, уявна компонента варіюється в межах 3%. Ця відтворюваність дозволяє багатократне використання біосенсора, тому у всіх

подальших експериментах було зроблено п'ятикратне повторення вимірювань і проаналізовано його результати.

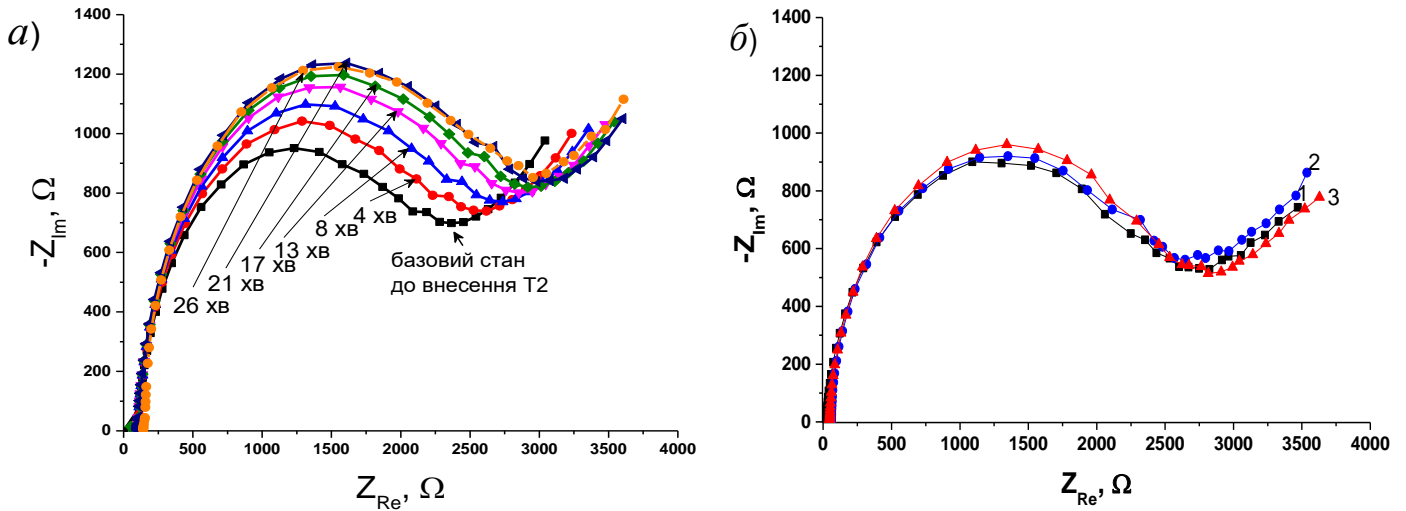


Рис. 5. Динаміка формування сенсорного сигналу в процесі гібридизації 1 нМ $T2$ з іммобілізованими на сенсорній поверхні $P2$ в $2 \times SSC$ буферному розчині (а); відтворюваність кривої імпедансу після зазначених циклів гібридизації-регенерації (б: 1 першого циклу; 2 другого циклу; 3 третього циклу)

Для дослідження селективності отриманого біосенсора порівняли результати гібридизації на сенсорній поверхні трьох одноланцюгових олігонуклеотидів: $T2$ (повністю комплементарні), TN (відрізнялися від $T2$ одним нуклеотидом) і TC (некомплементарні). Після 20-хвилинної інкубації геносенсора з 50 нМ некомплементарною послідовністю TC біосенсорний відгук становив $\Delta R_t^{TC} = 120 \text{ Ом} \pm 30 \text{ Ом}$, що незначно перевищує рівень шуму але, значно менше відгуку на введення 1 нМ повністю комплементарних олігонуклеотидів $T2$ $R_t^{T2} = 630 \text{ Ом} \pm 40 \text{ Ом}$ (рис. 6).

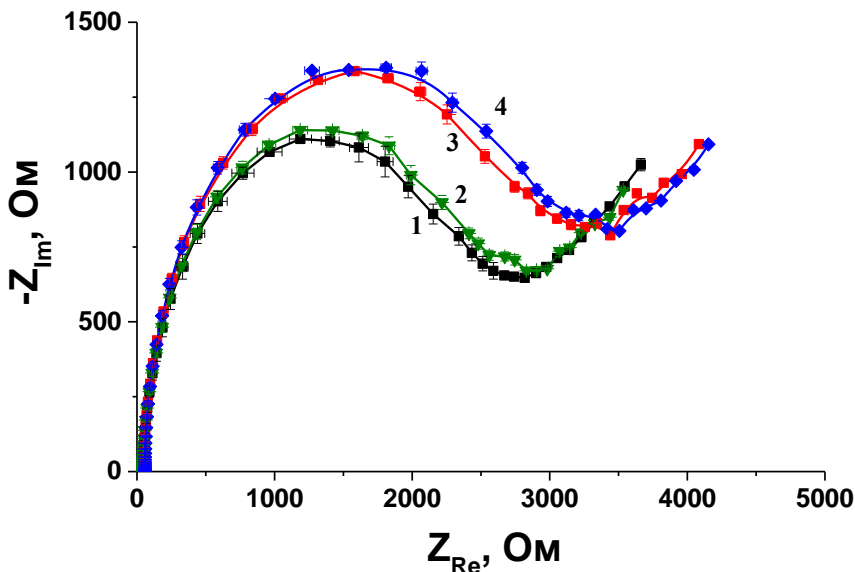


Рис. 6. Діаграма Найквіста, що відображає початковий імпеданс системи (1) та результати гібридизації на сенсорній поверхні трьох одноланцюгових олігонуклеотидів: 50 нМ TC (2), 1 нМ TN (3), 1 нМ $T2$ (4).

Для розрізнення повністю комплементарних олігонуклеотидів $T2$ від частково комплементарних TN було зменшено кратність гібридаційного буферного розчину. Зменшення іонної сили буферного розчину ослаблює структуру дволанцюгової ДНК, причому цей вплив буде різним на повністю комплементарні та частково комплементарні дуплекси. Використання розчину $0,5\times SSC$ дійсно привело до відчутного покращення селективності біосенсора в порівнянні з $2\times SSC$ (рис. 7).

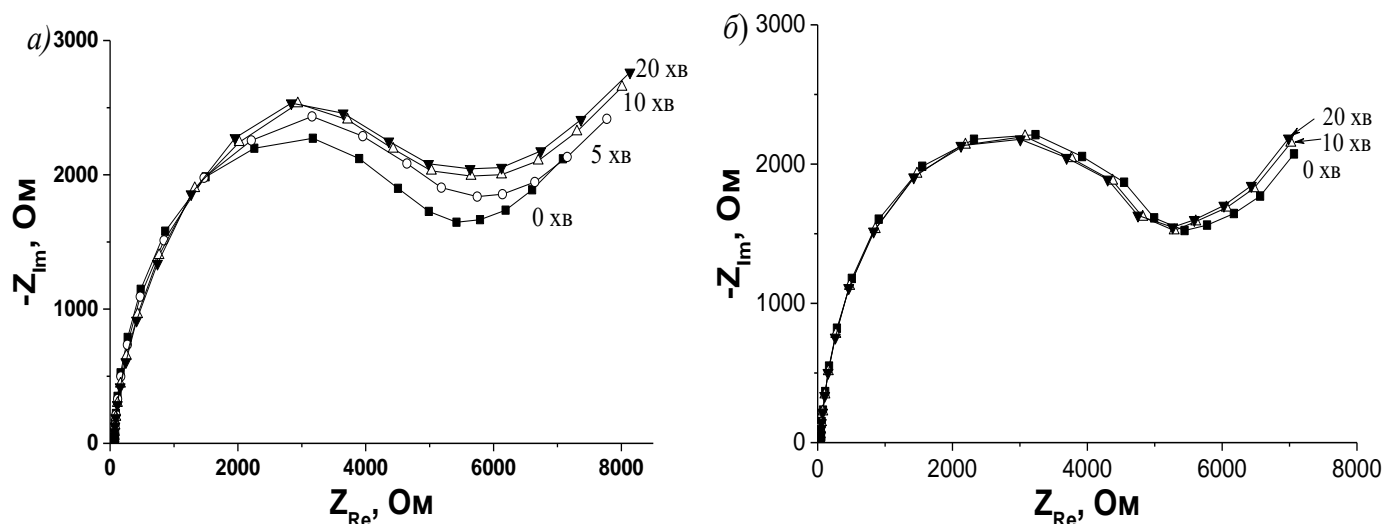


Рис. 7. Динаміка формування сенсорного сигналу в процесі гібридації олігонуклеотидів $T2$ (а) та TN (б) з іммобілізованими на сенсорній поверхні $P2$ в $0,5\times SSC$ буферному розчині

Якщо введення у вимірювальну комірку $1\text{ нМ } T2$ викликає зміни поверхневого опору на сотні ом ($\Delta R_{t_{T2}} = 410\text{ Ом} \pm 50\text{ Ом}$), то зміни поверхневого опору при введенні $1\text{ нМ } TN$ ($\Delta R_{t_{TN}} = 49\text{ Ом} \pm 42\text{ Ом}$) практично не відрізняються від похибки вимірювань. Такий показник як співвідношення зміни сенсорного відгуку, отриманого при гібридації $P2-T2$, до зміни сенсорного відгуку, отриманого при гібридації $P2-TN$, у $2\times SSC$ буферному розчині складав $632\Omega / 508\Omega \approx 1,2$, а у $0,5\times SSC$ – сягнув величини $412\Omega / 45\Omega \approx 9,2$. Тобто, було досягнуто суттєвого рівня розрізнення олігонуклеотидів, при цьому використання ЕІС як методу вимірювання дозволило зменшити граничну концентрацію детектування ДНК з 20 нМ (метод ППР, Rachkov et al., 2011) до 1 нМ при збереженні селективності до однонуклеотидної заміни.

Розроблений біосенсор на базі методу спектроскопії імпедансу має високу чутливість та можливість відчутного здешевлення і мініатюризації біосенсорної системи, при подальшій розробці кондуктометричного сенсора. До недоліків цього біосенсорного методу належить складність обробки спектрів імпедансу, що створює проблеми при роботі в реальному часі.

Розробка геносенсора ППР для визначення послідовності гібридного гена *bcr-abl*

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 протеїна 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. 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. Все більше починають застосовувати молекулярно-біологічні методи виявлення гібридного гена *bcr-abl*, наприклад, полімеразну ланцюгову реакцію, флуоресцентну гібридизацію *in situ* (FISH) тощо.

В даній роботі запропоновано метод виявлення варіанту перебудови гібридного гена *bcr-abl* за допомогою гібридизаційного ДНК-сенсора. Для селективного розпізнавання послідовності гена було обрано ДНК-пробу *mod-Ph* (GCT GAA GGG CTT TTG AAC TCT GCT), 24-основний олігонуклеотид, що складається з фрагментів генів *bcr* та *abl* рівної довжини у місці їх стикування при перебудові e13a2 (b2a2). Під час створення біоселективного елемента сенсора ППР досліджували взаємодію тіюльованих проб з золотою сенсорною поверхнею в реальному часі. Як наслідок була визначена оптимальна густина іммобілізованих ДНК-проб для ефективної гібридизації ДНК-мішеней (рис. 8). Рівень сенсорного відгуку при гібридизації *P1* з іммобілізованим *mod-Ph* зростає зі збільшенням поверхневої густини останнього до 112 нг/см², яку отримали при іммобілізації 1 мкМ *mod-Ph*. Такий рівень поверхневої густини є оптимальним, бо подальше збільшення густини іммобілізованих проб практично не викликало приросту рівня гібридизації. Це відбувається через те, що при досягненні деякої величини поверхневої густини іммобілізованих проб суттєво зростають як стеричні перешкоди, так і електростатичне відштовхування однойменно заряджених молекул олігонуклеотидів.

Для збільшення селективності гібридизаційного геносенсора використовували дві стратегії посилення жорсткості умов гібридизації: зменшення іонної сили буферного розчину та збільшення температури.

Для аналізу роботи біосенсора в буферних розчинах різної іонної сили було використано модель Ленгмюра, яка приваблива своєю простотою і універсальністю. З її допомогою було визначено кількість ДНК-проб, що можуть вступити у взаємодію з ДНК-мішенями в залежності від комплементарності послідовностей і складу гібридизаційного буферного розчину. Внаслідок зменшення іонної сили кількість доступних олігонуклеотидів-проб для взаємодії з повністю комплементарними олігонуклеотидами-мішенями *P1* зменшилась лише на 25%, а в випадку частково комплементарних олігонуклеотидів-мішеней *Vcres14* – на 52% (її значення пропорційне частці вільного члена до тангенсу кута нахилу відповідної прямої з діаграми Скечарда, рис. 9). При цьому в нашій гетерогенній системі експериментально визначені величини рівноважних констант дисоціації не сильно змінюються в залежності від буферного розчину і комплементарності пари ($K_d=69-134$ нМ), а їх значення відповідають відчутно меншій зміні енергії Гіббса ($\Delta G_{mod-Ph\&P1}^{exp}=-9.4$ ккал/моль;

$\Delta G_{\text{mod-Ph\&Bcrex14}}^{\text{exp}} = -9.8$ ккал/моль), ніж та, що була отримана за допомогою сервісу DINAMelt для гомогенної системи ($\Delta G_{\text{mod-Ph\&P1}}^{\text{theor}} = -14.6$ ккал/моль; $\Delta G_{\text{mod-Ph\&Bcrex14}}^{\text{theor}} = -33.7$ ккал/моль).

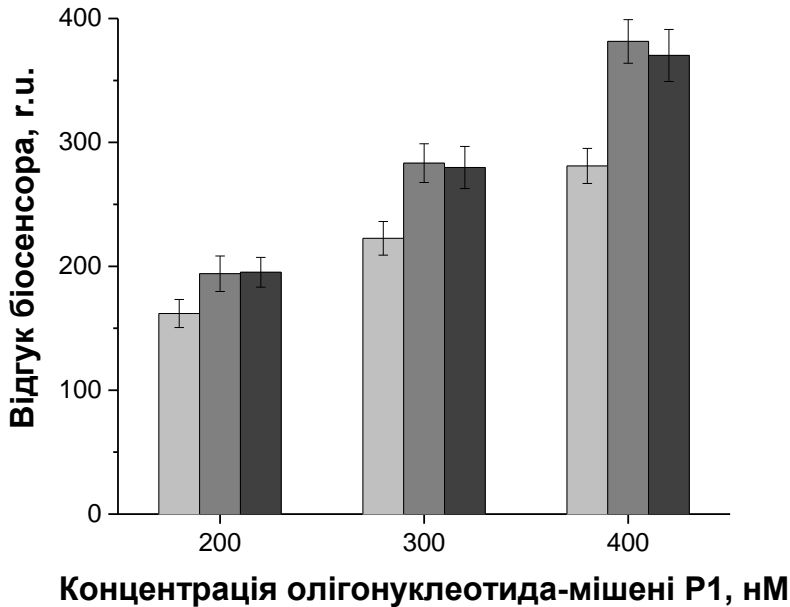


Рис. 8. Відгук біосенсора ППР при гібридизації з використанням різних концентрацій ДНК-мішеней в залежності від поверхневої густини ДНК-проб
(\square 86 нг/см²,
 \square 112 нг/см²,
 \square 129 нг/см²)

Відповідно за більш жорстких умов гібридизації частково комплементарні ДНК-мішені відчутно гірше гібридизуються з пробами, на відміну від повністю комплементарних, що і є основою механізму підвищення селективності сенсора.

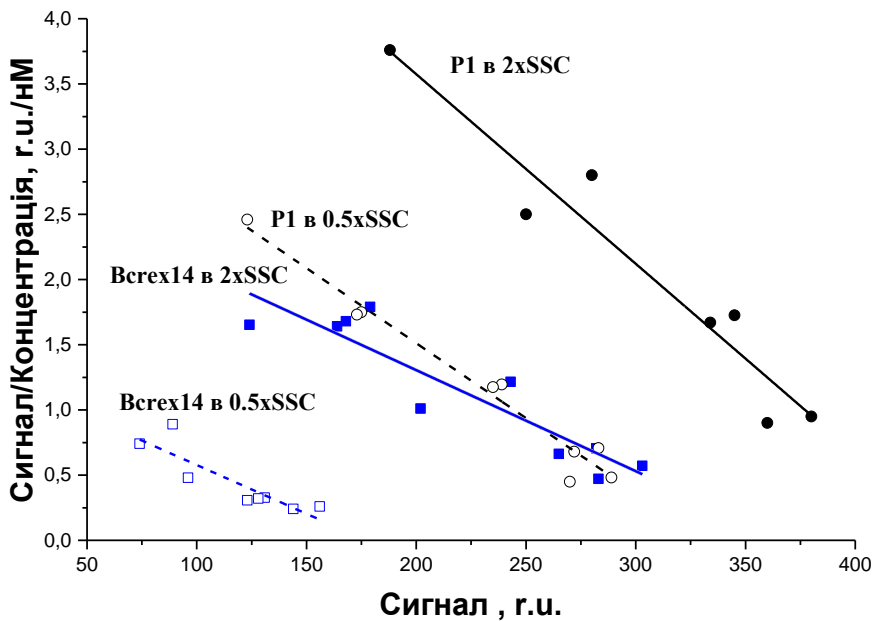


Рис. 9. Діаграми Скетчарда при аналізі гібридизації P1 та Bcrex14 в буферних розчинах 2×SSC, 0,5×SSC

Термодискримінація гібридизації олігонуклеотидів. Температура, мабуть, найбільш зручний в керуванні фактор впливу на гібридизацію ДНК. На сьогоднішній день існує багато програм здатних визначати температуру плавлення дволанцюгової

ДНК будь-якої нуклеотидної послідовності. В роботі використано таку програму з сервісу DINAMelt, за допомогою якої було розраховано величини температури плавлення дуплексів проби і різних ДНК-мішеней. В $2\times$ SSC буферному розчині температура плавлення комплексу *mod-Ph* і *P1* становить $64,0\text{ }^{\circ}\text{C}$, а дволанцюгової ДНК утвореної *mod-Ph* і *Vcrex14* $39,2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Реалізація термодискримінації вимагала комплексного апаратного рішення, яке було реалізовано в співпраці з Інститутом фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України. Для спектрометра ППР «Плазмон б» було створено терморегулюючу комірку і відповідне програмне забезпечення. Створена комірка здатна забезпечити швидке нагрівання аналізованого буферного розчину, до заданої температури і контролювати її з точністю до $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Крім того, з її допомогою можна чітко відслідковувати процес охолодження буферного розчину для визначення моменту повернення до початкової температури.

Для того, щоб забезпечити дискримінацію олігонуклеотидів по температурі плавлення подвійної спіралі ДНК потрібно знайти таке значення температури, при якому комплекс *mod-Ph* та частково комплементарного *Vcrex14* буде розплавлено, а повністю комплементарна послідовність *P1* буде все ще надійно зв'язана з пробою *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* за температур від $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ з кроком у $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Як видно з рис. 10, дволанцюгові структури, сформовані повністю комплементарними олігонуклеотидами *P1* та *mod-Ph* зберігаються без істотних змін до $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, а дволанцюгові структури, сформовані частково комплементарними олігонуклеотидами *Vcrex14* та *mod-Ph*, починаючи з $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, практично повністю руйнуються. Таким чином, можна стверджувати, що термодискримінація зазначених олігонуклеотидів ефективно відбувається в діапазоні температур від $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ до $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Даний метод дуже гнучкий, оскільки за допомогою розробленого пристрою температуру можна контролювати з точністю до $0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$, а час промивання нагрітим буфером можна вибирати практично без обмежень.

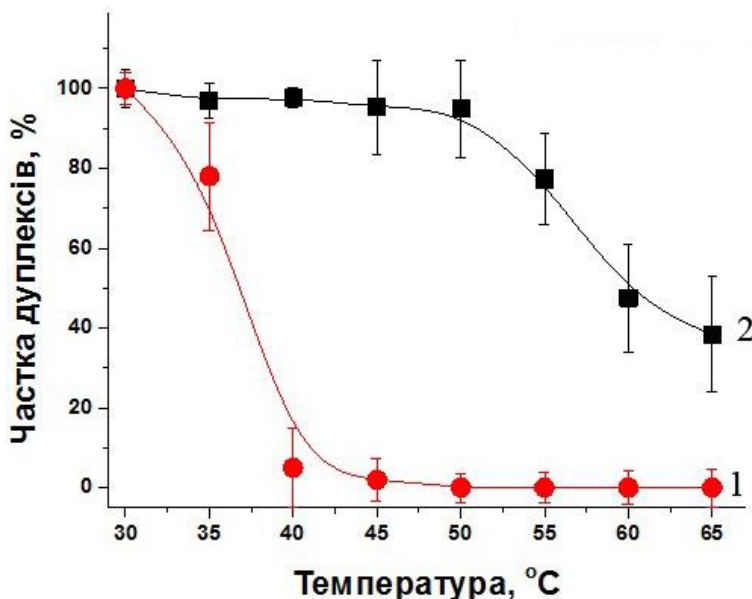


Рис. 10. Результати температурного плавлення дволанцюгових ДНК утворених пробою *mod-Ph* та олігонуклеотидами-мішенями *Vcrex14* (1) та *P1* (2).

Для досягнення термодискримінації досліджуваних послідовностей нуклеїнових кислот було застосоване нагрівання до $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 11), ця температура є значно

нижчою, ніж точка плавлення дуплексів *mod-Ph/P1*, але дещо вище T_m дуплексів *mod-Ph/Vcrex14*, розрахованих для гомогенних умов.

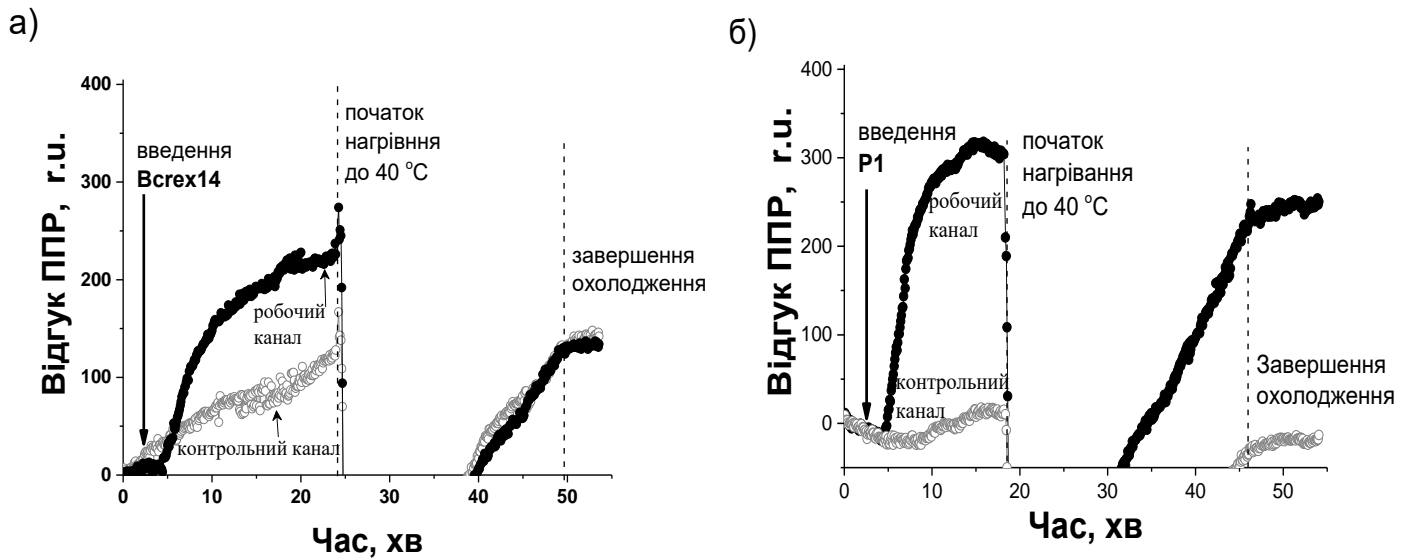


Рис. 11. Дискримінація олігонуклеотидів *Vcrex14* (а) та *P1* (б) за допомогою контрольованої зміни температури в буферному розчині $2\times\text{SSC}$, шляхом плавлення їх комплексів з ДНК-пробою

Термодискримінація на базі сенсора ППР досягалась в три кроки. Спочатку визначали рівень сенсорного відгуку, що відповідає гібридизації 200 нМ олігонуклеотидів-мішеней з іммобілізованими олігонуклеотидами-пробами при початковій температурі 30 °С. Наступним кроком стало промивання вимірювальної комірки біосенсора ППР буферним розчином обраної температури 40 °С впродовж 5 хв. В результаті цієї процедури слабкі дволанцюгові комплекси ДНК (ті, що характеризуються температурою плавлення близькою до обраної температури промивання) розпадаються і буферний розчин, що протікає через вимірювальну комірку, видаляє звільнені олігонуклеотиди. Тому на третьому кроці після такого промивання і подальшого охолодження вимірювальної комірки до початкової температури рівень сенсорного відгуку відображав тільки ту кількість дволанцюгових структур, що не розплавилась.

Як видно з рис. 11, дволанцюгові структури, сформовані повністю комплементарними олігонуклеотидами *P1* та *mod-Ph* зберігаються без істотних змін після завершення нагрівання до 40 °С, а дволанцюгові структури, сформовані частково комплементарними олігонуклеотидами *Vcrex14* та *mod-Ph* повністю руйнуються, це забезпечує надійне розпізнання послідовностей *P1* та *Vcrex14*.

Підсилення сигналу гібридизації олігонуклеотидів за допомогою НЧЗ. У випадку детектування відносно малих молекул підсилення сигналу за допомогою НЧЗ являє собою вагомe доповнення до класичного методу ППР. Головною проблемою розробки методу підсилення відгуку ППР за допомогою наночастинок є формування неспецифічного сенсорного сигналу через агрегацію НЧЗ. Величина неспецифічного сигналу залежать від іонної сили і рН середовища та поверхневої модифікації як самих

наночастинок, так і сенсорної поверхні. Тому в роботі було запропоновано метод контролю густини ДНК на поверхні НЧЗ і показано, що при 0,5 нМ концентрації НЧЗ в буферному розчині $0,2 \times \text{SSC}$ агрегації наночастинок золота не спостерігалось.

Використання методу селективного підсилення сигналу за допомогою НЧЗ модифікованих комплементарним олігонуклеотидом привело до виникнення відгуку в понад 1000 г.у. (рис. 12 б), в той час як введення тієї ж концентрації наночастинок, модифікованих іншим, частково комплементарним олігонуклеотидом, не спричиняє перевищення рівня шуму (менше 10 г.у., рис. 12 а), а введення такої ж кількості вільних олігонуклеотидів (20 нМ розчину комплементарних ДНК, послідовність яких є ідентичною олігонуклеотидам на поверхні НЧЗ) викликало відгук близько 23 г.у.

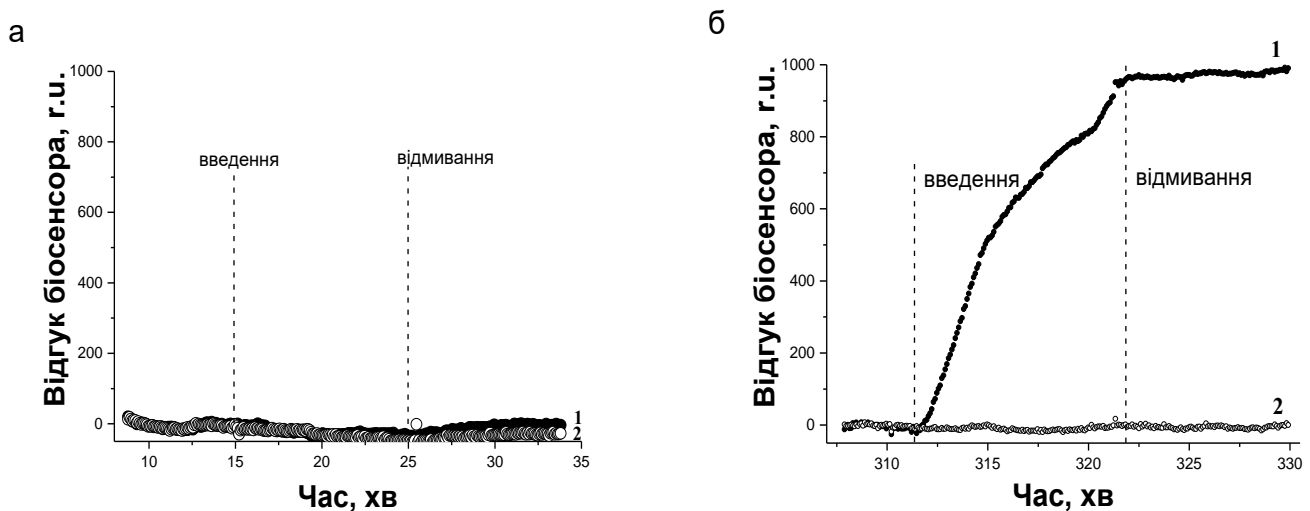


Рис. 12 Сенсограми ППР, які демонструють відгук біосенсора на внесення в робочий канал (1) НЧЗ, модифікованих олігонуклеотидами, некомплементарними (а) та комплементарними (б) до олігонуклеотидів, іммобілізованих на сенсорній поверхні. Через контрольний канал (2) здійснювалось прокачування буферного розчину

Продемонстрований в роботі метод підсилення сигналу і чутливості аналізу має великий потенціал, він здатний забезпечити надійну реєстрацію субнаномолярних концентрацій олігонуклеотидів на базі методу ППР і здатний працювати в режимі реального часу.

ВИСНОВКИ

В даній роботі вперше було розроблено два ДНК-біосенсори: 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.

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 одонуклеотидну 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/см², що відповідає інкубації впродовж 1 години 1 мкМ розчину проби в 0,5 М КН₂РO₄), 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 НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Мацішин М.Й. Вплив характеристик системи тонкоплівковий перетворювач-буферний розчин на кондуктометричний біосенсор, створений на її основі. / Мацішин М. Й., Пешкова В. М., Мельник В. Г., Кукла О. Л., Мамикін А. В., Семеничева Л. М., Дзядевич С. В., Солдаткін О. П. // Сенсорна електроніка та мікросистемні технології. – 2013. – Т10. – №2 . – С. 152–158.

Дисертант виконав експерименти по дослідженню тонкоплівкових перетворювачів, запропонував концепції і відпрацював методику тестування кондуктометричних перетворювачів. Написання статті було здійснено за його безпосередньої участі.

2. Matsishin M. Experimental approach using covalently attached fluorophore for quantification of oligonucleotide immobilization on gold nanoparticles / Matsishin M., Rachkov A., Losytskyu M., Soldatkin A. // Colloids Interface Sci. Commun. – 2014. – №1. – P. 35–38.

Дисертантом було проведено основну частину експериментальної роботи, написання статті було здійснено за його безпосередньої участі.

3. Rachkov A. Investigations of aggregation stability of gold nanoparticles at their interactions with compounds bearing thiol and / or amino functional groups. / Rachkov A., Matsishin M., Chegel V., Lopatynskiy A., Yanchuk I., Soldatkin A. // Chemical Sensors. – 2014. – №4. – P. 8–13.

Дисертантом було зроблено частину експериментальної роботи, написання статті було здійснено за його безпосередньої участі.

4. Мацишин М. Й. Дослідження рівня іммобілізації олігонуклеотидів на поверхні наночастинок золота за допомогою експериментального підходу з використанням флуорофора Су3 / Мацишин М. Й., Рачков О. Е., Галушкіна А. А., Солдаткін О. П. // Сенсорна електроніка та мікросистемні технології. – 2014. – №11. – С. 31–41.

Дисертантом було проведено більшу частину експериментальної роботи, написання статті було здійснено за його безпосередньої участі.

5. Matsishin M. J. SPR investigations of the formation of intermediate layer of the immunosensor bioselective element based on the recombinant Staphylococcal protein A / Rachkov A. E., Bakhmachuk A. O., Gorbatiuk O. B., Matsishin M. J., Khristosenko R. V., Ushenin Iu. V., Soldatkin A. P. // Biopolymers and Cell. – 2015. – №31. – P. 301–308.

Дисертант написав програму для аналізу файлів ППР, зробив значну частину розрахунків та аналізу експериментальних даних, брав безпосередню участь в написанні статті.

6. Matsishin M. Development of impedimetric DNA biosensor for selective detection and discrimination of oligonucleotide sequences of the rpoB gene of Mycobacterium tuberculosis / Matsishin M., Rachkov A., Errachid A., Dzyadevych S., Soldatkin A. // Sensors Actuators B Chem.. – 2016. – №222. – P. 1152–1158.

Дисертантом було самостійно проведено всю експериментальну роботу, більшу частину аналізу експериментальних даних. Написання статті було здійснено за його безпосередньої участі.

7. Matsishin M. J. SPR Detection and Discrimination of the Oligonucleotides Related to the Normal and the Hybrid bcr-abl Genes by Two Stringency Control Strategies / Matsishin M. J., Ushenin Iu. V., Rachkov A. E., Solatkin A. P. // Nanoscale research letters. – 2016. – №11. – P. 11–19.

Дисертантом було самостійно проведено всю експериментальну роботу, більшу частину аналізу експериментальних даних, він брав участь в розробці концепції термодискримінації ДНК. Написання статті було здійснено за його безпосередньої участі.

8. Изучение электрических характеристик кондуктометрических преобразователей на основании разных металлов для создания ферментных биосенсоров/ М. Мацишин, В. Пешкова, В. Мельник [та ін.] //5-та Міжнародна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології». Одеса, 4 – 8 червня, 2012 р. – С. 197.

Дисертант виконав експерименти по дослідженню тонкопліткових перетворювачів, запропонував концепції і відпрацював методику тестування кондуктометричних перетворювачів.

9. Elaboration of fluorescence method for quantification of DNA density on gold nanoparticle surface / М. Matsishin, А. Rachkov, А. Galuchkina [та ін.] // International

research and practice conference: NANO2013. Bukovel, 25 august – 1 september, 2013. – P. 65.

Дисертантом було виконано частину експериментальної роботи.

10. Спектрофотометричні дослідження взаємодії глутатіону та наночастинок золота стабілізованих цитрат-іонами / А.Галушкіна, М. Мацишин, О. Рачков, О. Солдаткін. // Шевченківська весна 2013: Біологічні науки. Київ, 18-22 березня, 2013. – С. 30.

Дисертант написав програму для аналізу файлів спектрометра «Unico», зробив частину розрахунків та аналізу експериментальних даних.

11. Investigations of aggregation stability of gold nanoparticles at their interactions with compounds bearing thiol and/or amine functional groups / M. Matsishin, A. Rachkov, V. Chegel [et al] // E-MRS FALL MEETING. Warsaw, 16-20 september, 2014. – P.4.

Дисертантом було проведено більшу частину експериментальної роботи.

12. Дослідження взаємодії рекомбінантного поверхневого протеїну A Staphylococcus aureus із додатковим залишком цистеїну та імуноглобулінів для розробки імунобіосенсорів на основі поверхневого плазмонного резонансу / А. Бахмачук, М. Мацишин, О. Рачков [та ін.] // XI Український біохімічний конгрес. Київ, 6-10 жовтня, 2014. – С.217.

Дисертант написав програму для аналізу файлів ППР, зробив значну частину розрахунків та аналізу експериментальних даних для визначення рівноважних констант.

13. Matsishin M. SPR investigation of the hybridization kinetics of the DNA sequences related to the normal and the hybrid bcr-abl genes / M. Matsishin, A. Rachkov, O. Soldatkin // Nanotechnology and Nanomaterials (NANO-2015). Lviv, 26-29 august, 2015. – P. 367.

Дисертант самостійно проробив всю експериментальну роботу, брав участь в розробці концепції термодискримінації та відпрацював її методуку.

14. Підсилення сигналу біосенсора ППР за допомогою НЧЗ при детектуванні ДНК послідовностей, пов'язаних з геном groV M. tuberculosis / М. Й. Мацишин, А. В. Головань, О. Е. Рачков [та ін.] // 7-ма Міжнародна конференція «Сенсорна електроніка та мікросистемні технології». Одеса, 30 травня – 3 червня, 2016. – С. 152

Дисертантом було виконано основну частину експериментальної роботи, запропонував методуку підсилення сигналу ППР за допомогою наночастинок, підготував постер.

15. Пат. 93555 UA, МПК В82У 35/00 (2014.01) Спосіб визначення рівня іммобілізації олігонуклеотидів на поверхні наночастинок золота / О.Е. Рачков, М. Й. Мацишин, О.П. Солдаткін; заявник Інститут молекулярної біології і генетики Академії України. — № u 201403772 ; заявл. 10.04.2014 ; опубл. 10.10.2014, Бюл. № 19, 2014 р.

Дисертантом було проведено більшу частину експериментальної роботи по відпрацюванню методу контролю густини іммобілізованої ДНК на поверхні НЧЗ. Він брав участь в написанні патентної заявки.

АНОТАЦІЯ

Мацишин М.Й. Розробка афінних біосенсорних систем для детектування мутацій пов'язаних з Rh'-позитивною лейкемією та резистентними формами туберкульозу. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, 2016.

В дисертаційній роботі вперше розроблено імпедиметричний ДНК-сенсор здатний визначати одонуклеотидну заміну в кодоні 531 гена *rhoB M. tuberculosis* при 1 нМ концентрації досліджуваної ДНК-мішені.

Також в роботі вперше розроблено біосенсор на основі спектроскопії ППР для детектування наявності гібридного гена *bcr-abl*, який може забезпечити високо селективне, швидке і надійне розпізнавання відповідних послідовностей ДНК-мішеней з границею детектування 20 нМ без використання молекулярних міток. Для покращення його робочих характеристик вперше було реалізовано концепцію термодискримінації повністю та частково комплементарних олігонуклеотидів за допомогою геносенсора ППР з терморегульованою коміркою. Реалізовано спосіб селективного підсилення сигналу ППР шляхом використання НЧЗ, модифікованих комплементарними пробі олігонуклеотидами-лінкерами.

Ключові слова: поверхневий плазмонний резонанс, електрична імпеданс спектроскопія, геносенсор, термодискримінація, наночастинки золота.

АННОТАЦИЯ

Мацишин М.И. Разработка аффинных биосенсорных систем для детектирования мутаций, связанных с Rh'-позитивной лейкемией и резистентными формами туберкулеза. - Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук за специальностью 03.00.20 - биотехнология. - Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, 2016.

В диссертационной работе впервые создан электрохимический (импедиметрический) ДНК-сенсор для определения одонуклеотидной замены в кодоне 531 гена *rhoB M. Tuberculosis* концентрацией 1 нМ и дискриминировать олигонуклеотиды, отличающиеся одной одонуклеотидной заменой.

Также в работе представлен впервые разработанный биосенсор на основании спектроскопии ППР для детектирования гибридного гена *bcr-abl*, он может обеспечить высоко селективное, быстрое и надёжное распознавание последовательностей ДНК-мишеней с пределом обнаружения 20нМ без использования молекулярных меток. Для улучшения его рабочих характеристик впервые реализована концепция термодискриминации полностью и частично комплементарных олигонуклеотидов с помощью геносенсора ППР с терморегулирующей ячейкой. Реализовано способ селективного усиления сигнала ППР путем использования золотых наночастиц, модифицированных комплементарными до пробы олигонуклеотидами-линкерами.

Ключевые слова: поверхностный плазмонный резонанс, электрическая импеданс спектроскопия, геносенсор, термодискриминация, наночастицы золота.

SUMMARY

Matsishin M. J. Development of affinity biosensor system for the detection of mutations associated with Ph'-positive leukemia and resistant forms of tuberculosis. - The manuscript.

Thesis for a degree of Philosophy Doctor (PhD) in Biology, specialty 03.00.20 - biotechnology. - Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016.

In present work, DNA sensors for recognition of the mutations in the sequences related to the *rpoB* gene of *Mycobacterium tuberculosis* and hybrid gene *bcr-abl* were developed. The main goal of this research was to develop scientific and technological approaches to the development of DNA sensors for detecting mutations associated with Ph'-positive leukemia and resistant forms of tuberculosis.

For detection of mutation in the codon 531 of the *rpoB* gene of *M. tuberculosis*, which causes resistance to anti-tuberculosis drug rifampicin, electrochemical (impedimetric) DNA sensor was developed. A bioselective element of the biosensor was formed on the gold electrode surface by immobilization of thiolated single-stranded DNA probes *P2*, which reproduce a corresponding fragment of the *rpoB* gene, and by passivation of the electrode surface (to reduce the non-specific adsorption) using 6-mercapto-1-hexanol. High selectivity of this biosensor has been shown: at injection of 1 nM complementary oligonucleotide *T2*, the charge transfer resistance (R_t) was significantly higher than that of 50 nM non-complementary oligonucleotides *TC* (632 Ω and 121 Ω , respectively). Moreover, a high level of discrimination between fully complementary oligonucleotides *T2* and single-base mismatch oligonucleotides *TN* was achieved by the increasing hybridization stringency (reducing the ionic strength of the hybridization buffer solution). The high sensitivity, selectivity and reproducibility of the sensor response were proved in the research.

For selective label-free real-time recognition of hybrid gene *bcr-abl*, surface plasmon resonance (SPR)- based biosensor was developed. Two stringency control strategies for detection of DNA hybridization and discrimination of fully and partially complementary 24-mer sequences were applied. These sequences are specific to the human normal *bcr* gene and the hybrid *bcr-abl* gene, protein product of which is responsible for chronic myelogenous leukemia.

Thermodynamic parameters of the oligonucleotides hybridization, which were obtained by using the web server DINAMelt, allowed to suppose the possibility for these stringency control strategies based (i) on the change of the hybridization buffer ionic strength and (ii) on the temperature elevation. The first one resulted in increase of the discrimination index of completely and partially complementary oligonucleotides from 1.8 in $2\times\text{SSC}$ to 2.9 in $0.5\times\text{SSC}$, for 50 nM concentration of the oligonucleotides. For implementation of the second stringency control strategy, SPR spectrometer measuring flow cell with built-in high-precision temperature control and regulation as well as

corresponding software was created. It is shown that the duplexes formed by the immobilized probes *mod-Ph* and completely complementary oligonucleotides *PI* remained without significant changes until ~ 50 °C, while the duplexes formed with partially complementary oligonucleotide *Bcrex14* almost entirely disrupted at 40 °C. Thus, the effective thermo discrimination of these oligonucleotides was achieved.

For improvement of the sensitivity of SPR-based DNA sensor, a method of selective amplification of the sensor response using gold nanoparticles modified by oligonucleotides, which are complementary to oligonucleotides immobilized on the sensor surface was elaborated.

In order to control the level of oligonucleotide immobilization on the surface of gold nanoparticles, a fluorescence-based experimental approach was proposed. The achieved selective amplification of the SPR-based DNA sensor response by modified gold nanoparticles allowed to decrease detection limit and to increase biosensor signal approximately one hundred times.

Keywords: surface plasmon resonance, electrochemical impedance spectroscopy, genosensor, thermodiscrimination, gold nanoparticles.