

УДК 543.257.5
©Бабкина, Улахович

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА(III) С РАЗЛИЧНЫМИ ФОРМАМИ ДНК С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ БИОСЕНСОРА ДЛЯ АНАЛИЗА СЫВОРОТКИ КРОВИ

С.С.Бабкина, Н.А.Улахович

Казанский государственный университет, 420008, Казань, Кремлевская-8,
Химический факультет, факс.- 8432-367641, e-mail: sofia-babkina@mail.ru

Изучено комплексообразование ионов Fe(III) с ДНК с использованием спектрофотометрических, вольтамперометрических данных и математического моделирования. Определена константа связывания комплекса Fe(III)-ДНК гипотетического состава 1 : 1 ($1,4 \times 10^4$). Установлен состав и определены константы устойчивости комплексов Fe(III) с различными формами ДНК. Для иммобилизованной денатурированной ДНК (д-ИДНК) соотношение нуклеотид : Fe(III) (1 : 2,25) и константа устойчивости комплекса максимальны. Д-ИДНК использована в составе амперометрического биосенсора для контроля содержания Fe(III) в сыворотке крови человека. Разработана селективная методика определения Fe(II) в виде комплексонага с нижней границей определяемых содержаний 1×10^{-7} моль/л. Линейная область определяемых концентраций для ионов Fe(II) составляет $1,0 \times 10^{-7}$ - $6,0 \times 10^{-5}$ моль/л. Проведено определение ионов Fe(III) в присутствии матричных элементов сыворотки крови: ионов Mg(II), Zn(II), Cu(II) и Al(III). Предложенная методика отличается хорошей воспроизводимостью, простотой пробоподготовки и экспрессностью.

Ключевые слова: ДНК, комплексы железа, биосенсор, анализ сыворотки крови

ВВЕДЕНИЕ. Изучение комплексообразования молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) с металлами, в частности, с ионами Fe(III) - интересная и актуальная проблема, поскольку позволяет выяснить особенности функционирования ДНК в организме, использовать координационные соединения для моделирования системы ДНК-металл и на основании полученной информации предсказать и количественно оценить действие различных металлов, в том числе и тяжелых, на структуру и функции ДНК.

Известно, что тяжелые металлы обладают высоким сродством к ДНК и, встраиваясь в ее структуру, оказывают мутагенные и канцерогенные эффекты [1-3]. Образование злокачественных опухолей сопровождается увеличением содержания тяжелых металлов в ДНК раковых клеток, в частности, количество железа в ДНК злокачественной опухоли молочной железы в три раза превосходит его содержание в ДНК, выделенной из доброкачественной фибромы [3]. Такое высокое сродство железа к ДНК может быть использовано для разработки метода анализа железа в сыворотке крови с использованием реакции комплексообразования ДНК-Fe(III). Определение содержания свободного железа в сыворотке крови важно потому, что железо является жизненно необходимым элементом организма, но его избыточное количество токсично для человека [4,5]. При диагностике анемии и установлении ее причин [6], для установления степени интоксикации и лечения заболевания сидероза [6,7] при попадании избыточного

БИОСЕНСОР ДЛЯ АНАЛИЗА СЫВОРОТКИ КРОВИ

количества железа в организм из окружающей среды и среды промышленных предприятий необходимы точные данные о содержании свободного железа в сыворотке крови. Существующие способы определения содержания свободного железа в сыворотке крови методом атомно-абсорбционной спектроскопии и спектрофотометрии очень длительны, трудоемки, требуют специальной пробоподготовки и дорогостоящего оборудования [8,9].

Использование электрохимических методов обеспечивает изучение сложной биологической системы ДНК-металл без разделения компонентов с высокой чувствительностью и селективностью [10,11]. Электрохимические биосенсоры (БС) на основе иммобилизованной ДНК и ее фрагментов объединяют чувствительность метода детекции с высокой специфичностью биомолекул, уменьшают количество расходуемой ДНК и позволяют разрабатывать современные методы анализа эффекторов ДНК в экологических и биологических объектах [10,12-15].

Задачей настоящего исследования было изучение комплексообразования ионов $Fe(III)$ с различными формами ДНК с целью выбора оптимальной формы для иммобилизации в составе амперометрического биосенсора и разработка анализа сыворотки крови на содержание свободного железа с помощью предложенного ДНК-содержащего БС.

МЕТОДИКА. Вольтамперометрические определения проводились с помощью вольтамперометрической системы SVA-1BM-01 "Аналитик" (Болгария). Рабочим электродом служил стационарный ртутно-пленочный электрод (СРПЭ) с серебряной подложкой ($d=0,5$ мм), либо разработанный БС, в котором мембрана с иммобилизованной денатурированной ДНК (д-ИДНК) закрепляется на поверхности СРПЭ с серебряной подложкой [16]. Электрод сравнения - насыщенный каломельный электрод (нас.к.э.). Растворенный кислород удаляли из исследуемых растворов током аргона в течение 15 минут, во время регистрации вольтамперограмм газ пропускали над раствором.

Электронные спектры поглощения были сняты на спектрофотометре Lambda EZ 210 и спектрофотометре U-2000 "Hitachi" (Япония) в кюветах толщиной 1 см. Точность измерения оптической плотности составляла $\pm 1\%$. Все измерения проводили при термостатировании 298 ± 2 К.

В работе использовали ДНК эритроцитов цыплят фирмы "Reanal": соотношение N/P 1,6-1,7, Растворы ДНК с концентрацией 0,01 мг/мл в физиологическом растворе (0,9% раствор NaCl) готовили по точной навеске. Концентрацию растворов ДНК определяли спектрофотометрически по поглощению при $\lambda=258$ нм.

В работе также использовали следующие химические реагенты и растворы: нитрат целлюлозы (НЦ) ФТ-30 типа коллоксилин марки ч. со средним содержанием азота 11,5-12%; органические растворители марки х.ч. (ацетон, толуол, гексан) и 25% раствор глутарового альдегида фирмы "Reanal"; фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) pH 7,3, раствор ЭДТА с концентрацией 0,1 моль/л, приготовленный из стандартного фиксанала; 25% раствор роданида аммония, приготовленный по точной навеске из препарата марки х.ч.

Исходный раствор $Fe(NO_3)_3$ с концентрацией $1,0 \times 10^{-3}$ моль/л готовили растворением соли (марки х.ч.) в тридистиллированной воде. Точную концентрацию раствора устанавливали методом комплексонометрии. Исследуемые растворы готовили по точной навеске и методом последовательных разбавлений.

Приготовление биочувствительной части амперометрического ДНК-содержащего биосенсора.

Образцы д-ИДНК получали путем растворения навески НЦ в системе органических растворителей при постоянном перемешивании на магнитной мешалке с последующим добавлением водного раствора ДНК (денатурацию проводят кипячением раствора ДНК на водяной бане с последующим резким

охлаждением) и раствора глутарового альдегида для химического связывания молекул д-ДНК с НЦ матрицей. После этого на поверхности чашки Петри формировали пленку и высушивали ее в течение 5 минут. Полученные образцы д-ИДНК хранили при $t = 2 - 5^\circ \text{C}$. Биочувствительную часть БС, полученную по данной методике, закрепляли на корпусе электрохимического детектора (СРПЭ) с помощью прижимных колец [16].

Обработка спектрофотометрических данных.

Обработку результатов спектрофотометрических исследований комплексообразования Fe(III)-ДНК проводили на основании зависимости оптической плотности растворов от концентрации ионов металла-комплексообразователя (Fe(III)) при постоянной концентрации лиганда ДНК (L) с использованием программы SPESSP [17]. Работа программы основана на решении уравнения для коэффициента молярной экстинкции ϵ путем минимизации целевой функции F :

$$F = \sum_{j=1}^N (A_{\text{эксп},j} - A_{\text{расч},j})^2 \frac{1}{\sigma^2 A_{\text{эксп},j}^2}$$

где $A_{\text{эксп},j}$ и $A_{\text{расч},j}$ - экспериментально измеренная и рассчитанная величина оптической плотности раствора соответственно; j и N - номер и количество экспериментов; σ - относительная погрешность измерения A . При пользовании программой SPESSP оценку достоверности полученных результатов проводили по критерию Фишера, исходя из величин σ и найденного значения F_{min} [18].

Расчет констант устойчивости комплексов $\beta = [\text{Fe}_n\text{L}_m]/([\text{Fe}^{3+}]^n \times [\text{L}]^m)$ проводили на основании выражения:

$$A = A_0 + \epsilon_L[\text{L}] + \epsilon_{\text{Fe}^{3+}}[\text{Fe}^{3+}] + \epsilon_{\text{FeL}}[\text{FeL}] + \epsilon_{\text{Fe}_2\text{L}}[\text{Fe}_2\text{L}] + \dots$$

где A - оптическая плотность раствора, содержащего различные формы ионов Fe(III) и ДНК, а ϵ_L , $\epsilon_{\text{Fe}^{3+}}$, ϵ_{FeL} , $\epsilon_{\text{Fe}_2\text{L}}$ - коэффициенты экстинкции соответствующих форм.

Для установления состава комплекса Fe(III) с д-ИДНК и его константы устойчивости спектрофотометрическим методом определяли равновесную концентрацию ионов Fe(III) в процессе комплексообразования. Для этого готовили серию растворов $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ (рН 2,5) с различной начальной концентрацией ионов Fe(III) в диапазоне от 1×10^{-6} до 1×10^{-4} моль/л, на 15 мин опускали в каждый из них НЦ мембрану с д-ИДНК. После проведения реакции комплексообразования при перемешивании брали аликвоту раствора нитрата Fe(III), добавляли 25%-ный раствор роданида аммония и измеряли D_{479} . Концентрацию ионов Fe(III) определяли с помощью градуировочной зависимости D_{479} растворов, содержащих роданидный комплекс Fe(III), от концентрации ионов Fe(III).

Определение содержания ионов Fe(III) в модельных растворах с помощью амперометрического ДНК-содержащего биосенсора. Амперометрический БС, содержащий д-ИДНК, погружали в электрохимическую ячейку с раствором $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ рН 2,5 различной концентрации на 15 мин. Затем раствор ионов Fe(III) сливали, ячейку промывали и заливали в нее 5 мл раствора ФСБ рН 7,3, содержащего 2,5 мМ ЭДТА, деаэрировали раствор током аргона в течение 20 мин и снимали вольтамперограммы в интервале потенциалов от -0,02В до -1,5В ($E_0 = -0,02\text{В}$, скорость наложения потенциала 0,5 В/с). Высоту катодного пика измеряли при потенциале -0,2В и по полученным данным строили градуировочный график зависимости тока восстановления комплексоната Fe(III) от концентрации ионов Fe(III). Полученный градуировочный график использовали для определения неизвестной концентрации ионов Fe(III) в модельных растворах.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Спектрофотометрическое изучение комплексообразования ионов Fe(III) с ДНК; выбор формы ДНК для иммобилизации в составе амперометрического БС. Как отмечалось выше, ионы железа (III), попадая в организм из окружающей среды, вызывают одно- и двунитевые разрывы молекул ДНК, находятся в избыточном количестве в клетке раковых опухолей.

БИОСЕНСОР ДЛЯ АНАЛИЗА СЫВОРОТКИ КРОВИ

Причем ионы Fe(III) , вследствие более высокого заряда и меньшего размера, образуют более прочные комплексы с ДНК, чем ионы Fe(II) [1,3,5]. С другой стороны, при нарушении процесса синтеза гемоглобина в организме происходит накопление свободных ионов железа, которые также оказывают токсический эффект на организм человека [4,6]. Поэтому представляет интерес изучение комплексообразования ионов Fe(III) с ДНК с учетом влияния среды для уточнения и моделирования механизма этого процесса в организме, тем более, что в литературе отсутствуют данные об истинном составе таких комплексов, особенно с иммобилизованной ДНК, хотя иммобилизация ДНК в составе БС повышает устойчивость ДНК к различным воздействиям, обеспечивает многократное использование дорогостоящего препарата и может позволить разработать методы определения железа в биологических и экологических объектах.

Процесс комплексообразования изучали в водном растворе HNO_3 pH 2,5, поскольку данная среда максимально стабилизирует ионы Fe(III) в негидролизованном состоянии. Согласно проведенным нами расчетов доли различных форм Fe(III) , существующих в указанных условиях, составляют для ионов Fe^{3+} - 0,324; для $[\text{FeOH}]^{2+}$ - 0,661, для $[\text{Fe(OH)}_2]^+$ - 0,016. Кроме того, при выбранном pH сохраняется биологическая активность ДНК, так как ДНК гидролизуется при pH ниже двух [1]. Присутствующий в среде нитрат-ион обладает минимальной склонностью к участию в комплексообразовании в качестве лиганда, и выбранные условия позволяют в дальнейшем, при анализе сыворотки крови, разрушить находящийся в ней комплекс Fe(III) с белком трансферрином.

В спектрах поглощения нативной ДНК (н-ДНК) (0,01 мг/мл) при pH 7,3 в физиологическом растворе наблюдается максимум полосы поглощения при $\lambda=258$ нм. Спектр поглощения ДНК в УФ области связан с электронными переходами в хромофорных группах пуриновых и пиримидиновых оснований [4]. На спектрах поглощения раствора ДНК и д-ДНК при pH 2,5 в присутствии ионов Fe(III) наблюдали увеличение D_{258} (гиперхромный эффект) и уширение полосы поглощения по сравнению со спектрами аналогичных растворов в отсутствие ионов Fe(III) , что свидетельствует о комплексообразовании данных ионов с молекулами ДНК, приводящем к нарушению структуры ДНК за счет разрыва водородных связей между азотистыми основаниями.

Для установления состава образующихся комплексов и определения их констант устойчивости (β) было проведено определение оптической плотности растворов ДНК при pH 2,5 и д-ДНК при pH 2,5 с постоянной концентрацией в зависимости от концентрации ионов Fe(III) в диапазоне от 1×10^{-6} моль/л до 1×10^{-4} моль/л. Реакцию комплексообразования Fe(III) с ДНК проводили в кинетическом режиме при перемешивании раствора с постоянной скоростью в течение 15 мин (выбрано как оптимальное).

Результаты представлены в таблице 1. Из этих данных видно, что при одних и тех же условиях комплексообразование ионов Fe(III) с термически денатурированной ДНК происходит гораздо эффективнее, чем с ДНК, находящейся в растворе с pH 2,5. Полученные значения β свидетельствуют о высокой устойчивости образованных комплексов и хорошо согласуются с литературными значениями, полученными на основании теоретических расчетов [19]. Меньшее значение β для комплекса ионов Fe(III) с д-ДНК по сравнению с комплексом ионов Fe(III) с ДНК при pH 2,5 может быть объяснено значительно большим числом центров связывания в д-ДНК.

На основе электронных спектров поглощения рассчитаны доли накопления (α) комплексов различного состава и построены графики накопления всех значимых форм изучаемых комплексов. Результаты представлены на рис 1 (кривые 2, 3). Из рисунка 1 и таблицы 1 видно, что при концентрации Fe(III) $7,08 \times 10^{-5}$ моль/л с термически денатурированной ДНК связывается в итоге в 2 раза больше ионов Fe(III) , чем с ДНК pH 2,5. Это подтверждает наше предположение о теоретически больших возможностях связывания ионов Fe(III) с д-ДНК (больше доступных центров связывания).

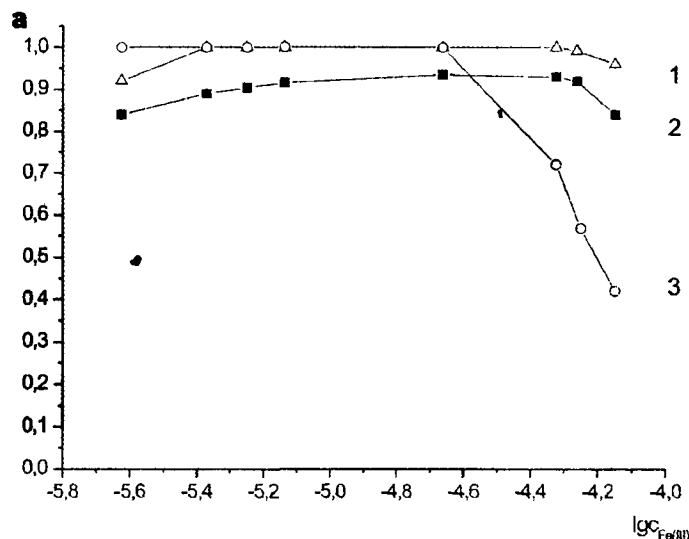


Рисунок 1.

Доли комплексов Fe(III)-ДНК в системах: (1) Fe(III) - д-ИДНК, pH 2,5; (2) Fe(III) - д-ДНК, pH 2,5; (3) - Fe(III) - ДНК, pH 2,5. Концентрация ДНК=0,01 мг/мл

Таблица 1. Результаты изучения комплексообразования ионов Fe(III) с различными формами ДНК

Форма ДНК	ДНК, pH 2,5	д-ДНК, pH 2,5	д-ИДНК, pH 2,5
Состав комплекса	[FeL*]	[Fe ₂ L]	[Fe ₃ L ₄]
Соотношение нуклеотид : Fe(III)	1 : 1	1 : 2	1 : 2,25
lgβ	16,31 ± 0,07	11,33 ± 0,07	59,78 ± 0,09
Доля комплекса при c _{Fe(III)} = 2,19×10 ⁻⁵ моль/л	1,00	0,93	1,00
Доля комплекса при c _{Fe(III)} = 7,08×10 ⁻⁵ моль/л	0,42	0,84	0,96

* L - один нуклеотид

Проведенные исследования процесса комплексообразования Fe(III)-ДНК являются основанием для выбора формы термически денатурированной ДНК для иммобилизации в составе НЦ мембраны амперометрического БС, как обладающей большей комплексообразующей способностью.

Для оценки параметров комплексообразования ионов Fe(III) с д-ИДНК спектрофотометрическим методом были определены равновесные концентрации ионов Fe(III) после проведения реакции комплексообразования и полученные результаты также обработаны методом математического моделирования.

Для подтверждения связывания ионов Fe(III) именно с молекулами д-ИДНК в составе НЦ мембраны в раствор с ионами Fe(III) опускали НЦ мембрану, не содержащую д-ИДНК. После перемешивания в течение 15 мин все операции проводили как описано в разделе "Методика". D₄₇₉ исследуемого раствора не уменьшилась и соответствовала D₄₇₉ раствора с исходной концентрацией ионов Fe(III) до погружения в него НЦ мембраны, что доказывает отсутствие неспецифической сорбции ионов металла на матрице-носителе.

Из данных таблицы 1 видно, что комплексообразование с д-ИДНК наиболее эффективно в сравнении с другими ее формами. Из рисунка 1 (кривая 1) видно, что в данных условиях уже начиная с концентрации ионов Fe(III) 4,25×10⁻⁶ моль/л, происходит полное связывание в комплекс д-ИДНК, доля комплекса достигает единицы и выходит на предел, сохраняя свое максимальное значение до 4,73×10⁻⁵ моль/л. Далее по мере увеличения концентрации ионов Fe(III) происходит

БИОСЕНСОР ДЛЯ АНАЛИЗА СЫВОРОТКИ КРОВИ

незначительная диссоциация образовавшегося комплекса и при концентрации ионов Fe(III) $7,08 \times 10^{-5}$ моль/л его доля составляет 0,96. Эта величина максимальна по сравнению с комплексами Fe(III) с другими формами ДНК при данной концентрации ионов Fe(III) (см. табл. 1 и рис. 1, кривые 1-3).

Большое значение константы устойчивости, полученное для комплекса состава 9:4, соответствует равновесию процесса комплексообразования с участием большого числа частиц, поскольку значение β , как и всех констант равновесия, связано с изменением свободной энергии Гиббса реакции комплексообразования соотношением $\Delta G = -RT \ln \beta$.

Результаты, полученные с помощью данной методики, позволяют установить, что форма д-ИДНК является лигандом с наибольшей комплексообразующей способностью и оптимальна для использования в составе БС. Это связано, по-видимому, с отсутствием межнитевых водородных связей, имеющих в форме н-ДНК. Кроме того, так как химическое связывание молекул д-ДНК с НЦ матрицей происходит сразу после термической денатурации ДНК и ее резкого охлаждения, то образование водородных связей внутри одной цепи с образованием молекул глобулярной конфигурации (клубков) очень ограничено, в отличие от неиммобилизованной д-ДНК [1,4]. В результате, в случае д-ИДНК мы имеем наиболее раскрученные и фиксированные на матрице молекулы д-ДНК с доступными центрами связывания.

На основании литературных данных и полученных экспериментальных результатов могут быть предложены следующие дополнительные по сравнению с нативной ДНК варианты связывания ионов Fe(III) с молекулами д-ИДНК, приводящие к более сложному составу комплексов и их большей устойчивости: образование внутринитевого хелата между N(7) и O(6) атомами гуанина и образование внутринитевых сшивок с N(7) атомами гуанина д-ИДНК.

Применение амперометрического ДНК-содержащего БС в анализе сыворотки крови на содержание ионов Fe(III) . С учетом изложенного выше, биочувствительная часть разработанного нами БС на основе СРПЭ была получена путем иммобилизации термически денатурированной ДНК на НЦ мемbrane (см. экспериментальную часть). Принимая во внимание результаты изучения комплексообразования ионов Fe(III) с ДНК, представляло интерес использовать данный БС для определения ионов Fe(III) в сыворотке крови человека.

Предлагаемая методика определения ионов Fe(III) в сыворотке крови с помощью амперометрического ДНК-содержащего БС основана, с одной стороны, на установленном нами высоком сродстве ионов Fe(III) к молекулам д-ИДНК, что позволяет провести эффективное концентрирование данных ионов из анализируемого раствора с малой концентрацией на мемbrane с д-ИДНК в составе БС. С другой стороны, в методике используется удаление ионов Fe(III) с поверхности БС обработкой его раствором ЭДТА (используемым в токсикологии в качестве антидота [7]). Более высокая устойчивость комплекса Fe(III) -ЭДТА (по сравнению с оцененной нами устойчивостью комплекса Fe(III) - д-ИДНК) позволяет реактивировать биочувствительную часть сенсора после концентрирования для многократного использования БС и определить более низкие концентрации ионов металла в анализируемом растворе.

На рисунке 2 представлены вольтамперограммы восстановления комплексоната Fe(III) , полученные после концентрирования ионов Fe(III) из анализируемых растворов на БС. Появление на вольтамперограмме катодного пика при - 0,2 В еще раз подтверждает факт разрушения комплексов ионов Fe(III) с д-ИДНК под действием ЭДТА. Величина этого сигнала зависит от концентрации ионов Fe(III) (см. рис. 2), а при их постоянной концентрации - от биологической активности ДНК, т. е. способности ее нуклеотидов вступать в реакции комплексообразования с данными ионами. Было показано, что д-ДНК после иммобилизации является биологически активной и сохраняет свою активность не менее 30 дней. В течение всего этого времени вымывание д-ДНК из НЦ мемbrane не наблюдалось. Равенство аналитических сигналов, полученных при использовании различных

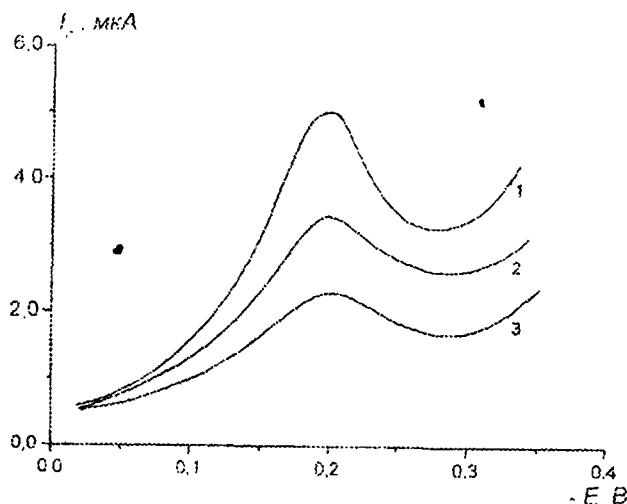


Рисунок 2.

Вольтамперограммы растворов комплексоната Fe(III): (1) $2,50 \times 10^{-5}$ моль/л Fe(III); (2) $1,25 \times 10^{-5}$ моль/л Fe(III); (3) $0,55 \times 10^{-5}$ моль/л Fe(III). [EDTA] = $2,5 \times 10^{-2}$ моль/л; ФСБ pH 7,3, 0,5 В/с. БС на основе ДНК.

участков мембраны с д-ИДНК равной площади, свидетельствует об однородности состава биочувствительной части сенсора. Для сокращения времени проведения анализа было выбрано оптимальное время реактивации 20 мин, по истечении которого высота анализируемого пика комплексоната Fe(III) перестает увеличиваться. Следует также отметить, что при необходимости можно легко заменить мембрану после проведения анализа на новую.

Результаты определения содержания ионов Fe(III) в модельных растворах с помощью градуировочного графика (рис.3), построенного при выбранных оптимальных условиях, представлены в таблице 2. Линейная область определяемых концентраций для ионов Fe(III) составляет $1,0 \times 10^{-7}$ - $6,0 \times 10^{-5}$ моль/л, что удовлетворяет решению поставленной задачи определения общего количества ионов Fe(III) в сыворотке крови с учетом литературных данных о содержании ионов Fe(III) в сыворотке в норме и при различных заболеваниях у детей и взрослых [6,8,9]. Нижняя граница определяемых содержаний составляет $1,0 \times 10^{-7}$ моль/л (Sr 0,33). В случае определения низких концентраций ионов металла объем раствора при накоплении можно увеличить.

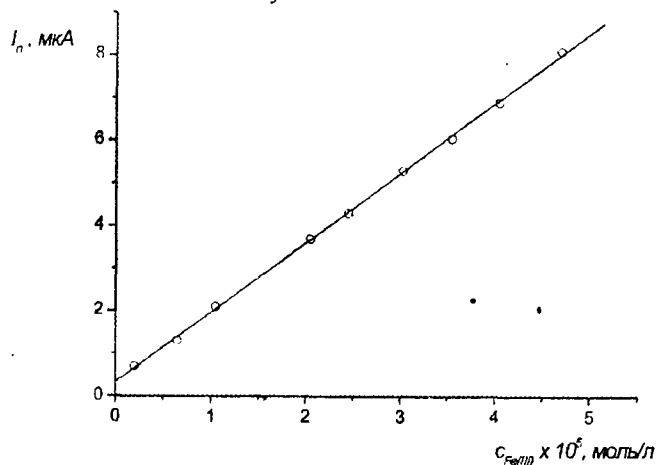


Рисунок 3.

Зависимость величины тока пика восстановления комплексоната Fe(III) при -0,2В от исходной концентрации ионов Fe(III) в модельном растворе

БИОСЕНСОР ДЛЯ АНАЛИЗА СЫВОРОТКИ КРОВИ

Таблица 2. Результаты определения ионов Fe(III) в модельных растворах (n=5, p=0,05)

Введено, ($\times 10^{-5}$ моль/л)	Найдено, ($\times 10^{-5}$ моль/л)	Sr
0,03	0,032 \pm 0,005	0,13
0,05	0,050 \pm 0,005	0,08
0,10	0,098 \pm 0,003	0,03
0,50	0,49 \pm 0,05	0,08
0,75	0,75 \pm 0,04	0,04
1,00	1,02 \pm 0,03	0,03

Для исследования влияния матричных элементов на определение ионов Fe(III) в сыворотке крови с помощью БС было проведено определение ионов Fe(III) в присутствии ионов Mg(II), Zn(II), Cu(II) и Al(III) в модельных растворах. Данные ионы были выбраны в качестве матричных, так как, исходя из данных о содержании различных ионов металлов в сыворотке крови здорового человека [8], эти ионы содержатся в сыворотке крови в соизмеримых с ионами Fe(III) количествах и обладают достаточным сродством к молекулам ДНК [1,5]. Результаты определения 2×10^{-5} моль/л ионов Fe(III) на фоне матричных компонентов представлены в таблице 3. Мешающее влияние других ионов исключается либо их значительно меньшим содержанием в сыворотке (менее чем 1×10^{-8} моль/л), либо отсутствием выраженного сродства к молекулам ДНК. В случае значительного избытка (больше чем 1:10) какого-либо металла, определение ионов Fe(III) можно проводить либо при достаточной разности потенциалов восстановления комплексонов металлов (250 мВ и более), либо при проведении дополнительной пробоподготовки.

Таблица 3. Влияние матричных компонентов на результаты определения 2×10^{-5} моль/л ионов Fe(III) (n=5, p=0,05)

Соотношение Fe(II) : M	Найдено, ($\times 10^{-5}$ моль/л)	Sr
1 : 1 M = Mg(II), Zn(II), Cu(II), Al(III)	2,1 \pm 0,3	0,12
1 : 5 M = Mg(II), Zn(II), Cu(II)	1,8 \pm 0,5	0,22
1 : 10 M = Mg(II), Zn(II)	1,9 \pm 0,4	0,17
1:100 M = Mg(II)	2,3 \pm 0,6	0,21

При анализе сыворотки крови на содержание свободного железа в электрохимическую ячейку вводили 3 мкл сыворотки крови и все дальнейшие операции проводили как описано в экспериментальной части; для нахождения неизвестной концентрации ионов Fe(III) использовали градуировочный график. Выбранное значение pH 2,5 позволяет разрушить комплекс Fe(III)-трансферрин в сыворотке крови и сохранить ионы Fe(III) в негидролизованном состоянии. Для установления достоверности предложенной методики в качестве контрольного метода при анализе сыворотки был использован метод спектрофотометрии [9]. Результаты представлены в таблице 4. Расхождение между средними величинами концентраций ионов Fe(III) в сыворотке, найденных двумя независимыми методами, незначимы и хорошо согласуются по t- и F- критериям (см. табл.4).

Таким образом, изучение взаимодействия д-ИДНК с ионами Fe(III) (которое представляет самостоятельный интерес) позволило, с одной стороны, определить количественные параметры этого взаимодействия, предложить варианты его механизма а, с другой стороны, выбрать оптимальную форму ДНК для разработки амперометрического БС для определения ионов Fe(III) в сыворотке крови, оптимизировать методику. Предложенная методика отличается селективностью,

Таблица 4. Сравнение результатов определения ионов Fe(III) в сыворотке крови амперометрическим БС и спектрофотометрическим (стандартным) методом ($n=5$, $p=0,05$, $t_{\text{табл}}=2,78$, $F_{\text{табл}}=6,39$)

N образца сыворотки крови	амперометрический БС		Спектрофотометрия		$t_{\text{расч}}$	$F_{\text{расч}}$
	$\times 10^{-5}$, моль/л	Sr	$\times 10^{-5}$, моль/л	Sr		
1	$0,9 \pm 0,2$	0,18	$0,7 \pm 0,1$	0,10	2,31	5,4
2	$1,2 \pm 0,3$	0,17	$1,4 \pm 0,2$	0,09	1,87	2,6
3	$1,5 \pm 0,4$	0,21	$1,2 \pm 0,3$	0,23	1,70	1,3
4	$2,2 \pm 0,4$	0,15	$2,3 \pm 0,2$	0,08	0,58	3,2

хорошей воспроизводимостью, простотой пробоподготовки, экспрессностью. Данная методика может быть использована в дополнение к известным методам контроля содержания свободного железа в организме человека, а также служить для определения содержания в биологических жидкостях онкопрепаратов на основе комплексов Fe(III) [6,8]. Важно также отметить, что данный принцип определения позволяет оценить токсичность металлов по отношению к ДНК и судить о возможных генетических последствиях даже незначительных количеств тяжелых металлов.

Работа выполнена при поддержке совместного гранта CRDF и Минобразования РФ REC 07.

Авторы выражают благодарность профессору Ю.И.Сальникову за обработку данных методом математического моделирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зенгер В. (1987) Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М., Мир.
2. Cai Y., Zhuang Z. (1999) Mutat. Res., **33**, 75-77.
3. Андроникашвили Э.Л. (1987) Биофизика, **32**, 782-799.
4. Ленинджер А. (1985) Биохимия. М., Мир.
5. Эйхгорн Г. (ред) (1978) Неорганическая биохимия, 2, М., Мир.
6. Беркоу Р., Флетчер Э. (ред) (1997) Руководство по медицине. М., Мир, с. 771-878.
7. Зигель Х., Зигель А. (ред) (1993) Некоторые вопросы токсичности ионов металлов. М., Мир, с. 222-227.
8. Тиц Н.У. (ред) (1986) Клиническая оценка лабораторных тестов. М., Медицина.
9. Архипова О.Г., Шацкая Н.Н., Семенова Л.С. (1988) Методы исследования в профпатологии (биохимические). М., Медицина, с. 123-125.
10. Palecek E. (2002) Talanta., **56**, 809-819.
11. Fojta M., Havran L., Kubicarova T., Palecek E. (2002) Bioelectrochemistry., **55**, 25-27.
12. Wang J., Rivas G., Cai X.H., Palecek E. (1997) Anal. Chim. Acta., **347**, 1-8.
13. Lucarelli F., Palchetti I., Marrazza G., Mascini M (2002) Talanta., **56**, 949-957.
14. Бабкина С.С., Улахович Н.А., Медянцева Э.П., Климович О.В. (1998) Прикл. биохимия и микробиология, **34**, 572-575.
15. Бабкина С.С., Улахович Н.А. (2000) Заводск. лаборатория, **66**, 147 - 149.
16. Budnikov H.C., Medyantseva E.P., Babkina S.S. (1991) J. Electroanal. Chem., **310**, 49-55.
17. Щербаклова Э.С., Гольдштейн И.П., Кочешков К.А. (1975) Изв. АН СССР. Сер. хим., 1262-1271.

БИОСЕНСОР ДЛЯ АНАЛИЗА СЫВОРОТКИ КРОВИ

18. *Shevelkova A.N., Salnikov Yu.I., Kuzmina N.L., Ryabov A.D.* (1996) FEBS Lett., **383**, 259-263.
19. *Сорокин В.А., Гладченко В.О., Валеев В.А.* (1983) Мол. биология, **17**, 868-876.

Поступила 23.09.2003

THE APPLICATION OF IRON(III) COMPLEXING WITH DIFFERENT FORMS OF DNA FOR THE DEVELOPMENT OF THE BIOSENSOR FOR BLOOD SERUM ASSAY

S.S.Babkina, N.A.Ulakhovich

Kazan State University School of Chemistry, Kremlevskaya-8, 420008, Kazan
fax: +7-8432-367641, e-mail: sofia-babkina@mail.ru

Fe(III) complexing with DNA was studied using spectrophotometric and voltamperometric data and mathematic simulation as well. The binding constant for the hypothetical complex Fe(III)-DNA 1:1 was $1.4 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l}$. Fe(III) complexes with various forms of DNA were characterized in terms of their composition and binding constants. The complex composition for the immobilized denatured DNA (d-IDNA) was found to be 1:2.25 (nucleotide:Fe(III)); this complex was characterized by the highest value of binding constant. d-IDNA was included into an amperometric biosensor for assay of Fe(III) content in human blood serum. The method of Fe(III) selective determination in the form of the complexonate was elaborated with the lower limit of detection of $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. The linear region of Fe(III) detection was within the following concentration range $1.0 \times 10^{-7} - 6.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Determination of Fe(III) in the presence of matrix blood serum ions such as Mg(II), Zn(II), Cu(II) and Al(III) was carried out. The proposed method is well reproducible, characterised with an easy sampling and speed.

Key words: DNA, iron complexes, biosensor, blood serum assay