

УДК 612.015.1; 577,15

©Коллектив авторов

ПОЛИМЕРНЫЕ АНТИТЕЛА (МИП) В ЭЛЕКТРОАНАЛИЗЕ БЕЛКОВ

В.В. Шумянцева^{1,2}, Т.В. Булко^{1,2}, И.Х. Байчоров², А.И. Арчаков²*

¹ООО “ИБМХ – ЭкоБиоФарм”

²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121 Москва, ул. Погодинская, д. 10; тел.: 7(495)246-58-20; факс: 7(495)245-08-57;
эл. почта: viktorina.shumyantseva@ibmc.msk.ru

Рассмотрены основные подходы к созданию высокоаффинных полимерных аналогов антител (полимеров с молекулярными отпечатками, МИП) для электроанализа функционально значимых белковых молекул, таких как миоглобин, тропонин Т, альбумин, ферритин, лизоцим, кальмодулин. Проанализированы основные типы мономеров для получения полимеров с молекулярными отпечатками, а также методы анализа взаимодействий МИП-белок, такие как плазмонный поверхностный резонанс (SPR), наногравиметрия с использованием кварцевого резонатора (QCM), спектральные и электрохимические методы. Приведены данные по электрохимической регистрации миоглобина на электродах, модифицированных МИП на основе *o*-фенилендиамина. Показано, что фактор импринтинга, рассчитанный как соотношение сигнала миоглобина при встраивании в молекулярно импринтированный полимер к сигналу миоглобина при встраивании в полимер, полученный без молекулярных отпечатков, составляет 2-4.

Ключевые слова: молекулярный импринтинг, полимеры с молекулярными отпечатками, наноматериалы, электроанализ, электрохимические сенсоры, белки.

DOI: 10.18097/PBMC20156103325

ВВЕДЕНИЕ

Ранняя диагностика соматических, психических и психосоматических заболеваний является актуальной проблемой как в плане профилактики заболеваний, так и для точного выбора методов и средств лечения. Анализ и количественное определение белков-маркеров заболеваний требует создания высокоселективных и высокочувствительных сенсоров, способных регистрировать единичные молекулы и их функционально-значимые комплексы [1]. В этом направлении разрабатываются биосенсоры, в которых рецепторный слой включает специфические распознающие компоненты.

Антитела, вследствие высокой аффинности и специфичности, являются одним из инструментов и диагностических средств в области молекулярной биологии, в терапевтическом мониторинге, биохимии и в биосенсорном анализе. Антитела широко используются в диагностике различных патологий, включая онкологические, сердечно-сосудистые, хронические воспалительные, инфекционные заболевания [2]. Тем не менее, использование антител имеет существенные ограничения. Белки семейства иммуноглобулинов характеризуются большими размерами и состоят из нескольких доменов,

сформированных за счёт внутридоменных дисульфидных связей и модифицированных путём гликозилирования [2]. Вследствие этого производство полноразмерных биомолекул возможно только в дорогостоящих системах экспрессии, таких, как клетки млекопитающих или насекомых. Применение биореагентов в анализе имеет ряд ограничений: такие реагенты дороги, неустойчивы при изменении температуры и при химических модификациях [3]. Кроме того, поликлональные антитела не могут быть получены для токсичных и ядовитых соединений. Получение антител с использованием животных имеет также этические проблемы, а развитие синтетических вакцин пока не получило широкого практического применения.

Решение проблемы получения специфических связывающих структур состоит в конструировании альтернативных молекул, обладающих способностью к высокоаффинному связыванию лиганда, но лишённых указанных выше недостатков. Для этого разрабатываются различные подходы, такие как получение альтернативных каркасных белков (АКБ), представляющих собой модифицированные природные полипептиды или их фрагменты [4], синтез нуклеотидных аналогов антител – аптамеров и соматомеров [5].

* - адресат для переписки

В качестве примеров АКБ можно привести такие структуры, как авимер, аднектин, антикалин, аффибоди, дарпин, домен типа Кунитца, тетранектин, PDZ-домен, связывающие различные белки. Например, получен авимер, связывающий цитокин. В основе конструирования АКБ лежит концепция формирования антигенраспознающего фрагмента за счёт комбинации консервативного белкового каркаса и пространственно ограниченного участка, состоящего из гипервариабельных пептидных сегментов, отвечающих за молекулярное узнавание. Для этого используются биоинформационные подходы. Для авимера каркасным белком является А-домен, для аднектина – фибронектин, для аффибоди – Z-домен белка А, для дарпина – антикириновый повтор [4].

Аптамеры в качестве аналогов антител получены лишь к ограниченному числу белков. Наиболее изученный тип аптамеров – тромбиновый аптамер. Синтез аптамеров проводится с помощью метода, получившего название “SELEX” (selective evolution of ligands by exponential enrichment) [6]. SELEX – метод, основанный на использовании комбинаторной библиотеки, состоящей из огромного числа отличающихся по нуклеотидной последовательности дезокси- или рибоолигонуклеотидов (10^{12} - 10^{15} видов молекул), для селекции в ней единичных олигонуклеотидов, которые способны специфически взаимодействовать с определенными молекулами лиганда [7]. Теория выбора определённой нуклеотидной последовательности в создании специфических аптамеров пока не разработана, хотя исследования в этом направлении ведутся [8].

И АКБ, и аптамеры являются природными полимерами, что может снижать их стабильность за счёт чувствительности к протеазам (белки), нуклеазам (олигонуклеотиды).

В связи с этим в настоящее время развивается новое направление – создание сенсоров на основе синтетических биомиметических (или “биоподражательных”) материалов, осуществляющих, как и биореагенты, селективное комплементарное связывание определяемых веществ по принципу “ключ-замок”. Такими биомиметическими материалами являются полимеры с молекулярными отпечатками или молекулярно-импринтированные полимеры (МИП, от англ. molecularly imprinted polymers) (рис. 1) [9, 10].

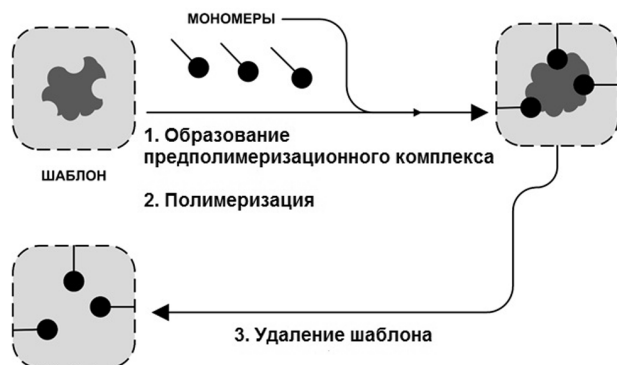


Рисунок 1. Общая схема приготовления МИП.

По сравнению с биореагентами, МИП обладают такими полезными свойствами, как простота получения, низкая стоимость, устойчивость к химическим и физическим воздействиям и возможность продолжительного хранения и многократного использования после регенерации [10].

Молекулярный импринтинг был предложен в 1930-х и 1940-х годах, соответственно [11-14], а затем в начале 1970-х годов был использован для разделения рацематов глицериновой кислоты [15]. Разработаны методы получения полимерных аналогов антител (молекулярно-импринтированные полимеры, МИП) для низкомолекулярных соединений с массой <1500 Да, таких как пестициды, лекарственные препараты, биологически активные соединения [16]. В настоящее время активно развивается синтез МИП для высокомолекулярных структур – белков-маркеров заболеваний, бактериальных клеток, вирусов, ДНК [17, 18]. Задачи разработки биосенсорных методов и создания устройств на их основе могут быть успешно решены с развитием именно МИП-технологий в качестве замены антителам, альтернативным каркасным белкам и аптамерам вследствие их стабильности, возможности химического синтеза в различных форматах, например, с помощью электросинтеза [19], а также возможностью получения как объемных (3D, bulk polymerization), так и плоскостных (2D, surface molecular imprinting) конструкций [20].

Необходимо отметить, что МИП находят применение не только в биосенсорном анализе, но и как искусственные ферменты, для твердофазной экстракции, биоразделения, аффинной детоксикации, а также для удаления мажорных белков из биологических жидкостей (рис. 2) [21].



Рисунок 2. Схема, иллюстрирующая применение МИП.

Синтетические биораспознающие молекулы на основе полимеров могут быть сопряжены с наноматериалами для повышения электропроводности, площади поверхности, электронтранспортных свойств, и вместе с тем, чувствительности скрининга [22, 23].

В отличие от АКБ и аптамеров, синтез МИП заключается в полимеризации мономеров, содержащих ненасыщенные двойные связи, в присутствии молекулы-шаблона. Полимеризация вокруг шаблона и последующее его удаление

приводит к получению специфических полостей, способных к связыванию целевых молекул (темплатов или шаблонов). Выбор мономера/мономеров и сопряжение МИП с наноматериалами является важным этапом при разработке синтеза и стратегии использования полимерных аналогов антител.

В представленном обзоре проанализированы публикации, посвященные электрохимическому анализу белков с помощью МИП в качестве распознающих молекул.

1. КЛАССИФИКАЦИЯ МИП. ОСНОВНЫЕ ПОДХОДЫ К СИНТЕЗУ МИП

Как правило, для получения полимеров с молекулярными отпечатками необходимы три этапа [9]: 1) мономер и молекулярный шаблон смешивают в подходящем растворителе до начала полимеризации. При этом происходит образование устойчивого предполимеризационного комплекса молекул мономера и вещества-шаблона. Благодаря образованию такого комплекса, молекулы функционального мономера определённым образом располагаются и фиксируются вокруг молекулы шаблона; 2) в результате полимеризации или поликонденсации предполимеризационных комплексов в присутствии сшивающего агента, при нагревании, под действием фотооблучения или в результате электрополимеризации образуется сшитый полимер с жесткой структурой; 3) удаление молекулярного шаблона из полимерной сетки. В результате в материале образуются полости (поры) – трёхмерные отпечатки, которые в идеале способны к специфическим комплементарным взаимодействиям с целевыми молекулами-шаблонами или близкими им по структуре соединениями. В понятие комплементарности входит соответствие отпечатка шаблону как по размеру и форме, так и по наличию в отпечатке дополняющих функциональных групп, способных к взаимодействию с функциональными группами молекулы-шаблона. В зависимости от типа связи (ковалентная или нековалентная) между молекулами мономера и шаблона различают ковалентный и нековалентный импринтинг. В качестве функциональных мономеров в нековалентном импринтинге используются: метакриловая кислота, *n*-винилбензойная кислота, акриловая кислота, 2-(трифторометил)-акриловая кислота, 4-винилпиридин, 2-винилпиридин, аллиламин, *N*-винилпирролидон, *N,N,N*-триметиламиноэтил-метакрилат, *N,N'*-диэтиламино-этилметакриламид, *N*-(2-аминоэтил)-метакриламид, *N,N'*-диэтил-4-стириламидин, 4-(5)-винилимидазол, акриламид, метакриламид, акрилонитрил, метилметакрилат (ММА), *транс*-3-(3-пиридил)-акриловая кислота, 2-гидроксиэтилметакрилат, стирол [9]. Кроме функционального мономера, как правило, необходим сшивающий реагент и инициатор. Получены МИП на основе силикагелей и полисилоксанов [24]. Более подробная информация о публикациях, посвящённых полимерам

с молекулярными отпечатками, представлена на сайте <http://www.mipdatabase.com/> [10, 25].

Для получения МИП на поверхности электрохимического сенсора (на рабочем индикаторном электроде) применимы следующие способы их формирования: химическая реакция полимеризации, фотооблучение, электрополимеризация. В качестве мономеров при электрополимеризации используют пиррол, *o*-фенилендиамин, фенол, производные тиафена (3,4-этилендиокситиафен), меркаптобензимидазол, карбазол для получения токопроводящих полимерных слоёв [26, 27].

Молекула-шаблон в данном подходе может быть, как электроактивной, так и неактивной. Электрохимическая регистрация проводится за счёт изменения электрохимических свойств поверхности модифицированного электрода при анализе раствора, содержащего молекулы шаблона или за счёт регистрации электроактивных свойств молекулы-шаблона при взаимодействии с импринтированным полимером.

Для повышения чувствительности анализа применяется подход, основанный на конъюгировании МИП с наноматериалами: наночастицами золота, углеродными нанотрубками, графеном, магнитными наночастицами, нанопроводами, квантовыми точками, наночастицами на основе кремния [22, 23, 27-32].

2. ОБЛАСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МИП ДЛЯ АНАЛИЗА БЕЛКОВ. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЕ СЕНСОРЫ НА БЕЛКИ, РАЗРАБОТАННЫЕ НА ОСНОВЕ МИП

Получение МИП для белковых молекул является более сложной задачей, чем МИП для низкомолекулярных соединений. Белки имеют вторичную, третичную и четвертичную структуры, большую молекулярную массу, могут денатурировать в жестких условиях полимеризации. Кроме того, на поверхности белков могут быть заряженные, нейтральные или неполярные гидрофобные группы, окруженные молекулами воды. Такие структуры чувствительны к pH, ионной силе, температуре, и к присутствию органических растворителей. Для анализа распознающих свойств полученных полимеров с молекулярными отпечатками используют спектральные методы (включая ЯМР, ЭПР, УФ и ИК-спектроскопию), молекулярное моделирование (методы *in silico*), наногравиметрические методы с использованием кварцевого резонатора [10].

Наиболее часто используемые белки-шаблоны для получения МИП – альбумин, гемоглобин, лизоцим [17]. Для получения полимеров с молекулярными отпечатками применяют 2D-структуры, то есть схемы для получения плоских поверхностей, покрытых полимерами. В качестве планарных поверхностей используют стекло, слюду, кремний. Метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR) был применен для анализа лизоцима [33]. Золотой

чип был модифицирован полимером на основе полиакриламида с использованием лизоцима в качестве молекулы-шаблона. Связывание анализировали методом SPR и по регистрации флуоресценции при связывании полимера с лизоцимом, меченым флуоресцеин изотиоцианатом. Анализ связывания лизоцима по сравнению с цитохромом *c* в качестве конкурирующего белка показал преимущественное связывание лизоцима с фактором селективности для МИП-поверхности, равным 9,8, а для НИП-поверхности – 2,9 [33]. Импринтирование в объёме (3D-структуры) как правило, характеризуется сложностью диффузии шаблона в полимер, однако получены МИП на основе акриламидных гидрогелей с использованием в качестве шаблона цитохрома *c*, лизоцима (в концентрационном диапазоне 0,5–4 мг/мл), гемоглобина (0,125 мг/мл – 1 мг/мл) [17, 34]. Анализ белков проводился спектральными методами по регистрации поглощения ароматических аминокислот при 280 нм, по поглощению гема при 410 нм для гемопroteинов гемоглобина, миоглобина и цитохрома *c* или колориметрически с использованием метода Бредфорд [35]. Таким образом, получены поверхности, позволяющие избирательно идентифицировать различные белки без использования специфических антител. МИП-технология может быть использована для обогащения образца целевым белком за счёт удаления мажорных белков.

Для анализа взаимодействия МИП/белок, повышения чувствительности и снижения диапазона определяемых концентраций в анализе белков используют методы SPR, наногравиметрические методы с использованием кварцевого резонатора (QCM) и электрохимические методы.

Бычий сывороточный альбумин (БСА, масса 66 кДа) был использован в качестве шаблона при получении МИП методом электрополимеризации 3-аминофенилборной кислоты (сканирование от -0,1 до +1,4 В относительно Ag/AgCl электрода сравнения при скорости сканирования 20 мВ/с, 5 циклов) [36]. Анализ связывания проводили методом SPR в диапазоне концентраций 0,02 мг/мл – 0,8 мг/мл, предел определяемых концентраций составил 0,02 мг/мл. Учитывая, что концентрация альбумина в плазме 40–50 мг/мл, достигнутый альбуминами предел определяемых концентраций имеет практическую значимость. Селективность полученного МИП была исследована в сравнении с белками гемоглобином (масса 64 кДа) и лизоцимом (14,4 кДа). Несмотря на разницу в массе анализируемых белков, селективность распознавания МИП на основе 3-аминофенилборной кислоты по сравнению с гемоглобином и лизоцимом была сравнимой, хотя предпочтительно на поверхности сенсора адсорбировался бычий сывороточный альбумин, используемый в качестве шаблона. Смещение резонансной частоты составило 0,08 градусов для БСА, и 0,045 градусов для гемоглобина, и 0,05 градусов – для лизоцима: целевой белок дает двукратное превышение сигнала

по сравнению с конкурирующими белками [36]. Такие полимеры с молекулярными отпечатками могут найти применение при обогащении биологических жидкостей минорными компонентами за счёт удаления мажорных белков.

Белки служат маркерами многих заболеваний. Например, концентрации миоглобина, тропонинов I и T, белка, связывающего жирные кислоты, креатинкиназы-МВ, гликогенфосфорилазы, лактатдегидрогеназы повышаются при остром инфаркте миокарда [37, 38, 39]. Электрохимический сенсор для анализа тропонина T был получен с использованием в качестве биораспознающего полимера на основе *o*-фенилендиамина [39, 40]. Авторы анализировали тропонин T в пробах методом циклической вольтамперометрии по регистрации пика электроактивного компонента феррицианида калия и методом спектроскопии электрохимического импеданса. Используемый диапазон концентраций составил 0,009–0,8 нг/мл с пределом определяемых концентраций 9 пг/мл, константа диссоциации $K_d = 2,4 \times 10^{-12}$ М. Так как концентрация тропонина T в норме составляет 0,1–0,5 нг/мл (2,7–13,5 пМ) [39], разработанные МИП-сенсоры обладают чувствительностью, применимой для анализа плазмы крови при остром инфаркте миокарда.

МИП для анализа миоглобина был получен при полимеризации 2-акрил-амидо-2-метил-1-пропансульфоновой кислоты и 3-аминоэтил метакрилата как заряженных компонентов, и акриламида и N,N-метиленабисакриламида как незаряженных компонентов [42], при электрополимеризации *o*-аминофенола [43]. Анализ связывания проводили методом квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВА) и спектроскопии электрохимического импеданса (СЭХИ). Константа диссоциации для МИП на основе акриламида по электрохимическим данным составила $K_d = 3 \pm 0,5$ мкМ, а предел определяемых концентраций 1,5 и 0,28 мкг/мл для ЭХИ и КВВА, соответственно [42]. Данные для полимера на основе *o*-аминофенола $K_d = 10$ мкг/мл (0,56 мкМ), а предел определяемых концентраций 1,5–0,8 мкг/мл для методов ЭХИ и КВВА, соответственно [42]. Физиологические значения концентрации миоглобина имеют широкий диапазон значений с условной линией границы инфаркта миокарда 100 нг/мл (5,6 нМ) [38]. МИП в качестве аналогов антител к миоглобину могут конкурировать с природными антителами в биосенсорном анализе.

Для повышения чувствительности биосенсорного анализа (предела определяемых концентраций) синтетические биораспознающие молекулы на основе полимеров могут быть сопряжены с наноматериалами [22, 23].

Электрохимический сенсор для анализа бычьего гемоглобина был разработан на основе нанокомпозитного материала графен–дофамин [30]. Для анализа гемоглобина авторы использовали метод дифференциальной импульсной вольтамперометрии (ДИВА). Сенсор продемонстрировал высокую

селективность и воспроизводимость, а также низкий предел определяемых концентраций: 2×10^{-10} мг/мл. В качестве конкурирующих белков были исследованы бычий сывороточный альбумин, лизоцим, папаин, яичный альбумин. Авторы определили удельную площадь поверхности ($40 \text{ м}^2/\text{г}$ и $16,8 \text{ м}^2/\text{г}$ и сорбционные свойства по объёму пор ($0,3 \text{ см}^3/\text{г}$ и $0,069 \text{ см}^3/\text{г}$ для систем графен-МИП и графен-НИП (НИП – полимер, полученный без шаблона), соответственно. Эти эксперименты убедительно доказали увеличение параметров в случае полимера с молекулярными отпечатками бычьего гемоглобина: наличие пор и высокую удельную поверхность для МИП-полимера.

МИП на основе непроводящего полимера полифенола и массива вертикальных углеродных нанотрубок был исследован как распознающий элемент для анализа ферритина, бычьего сывороточного альбумина и Е7 белка вируса папилломы [22]. Для анализа параметров сенсора использовали метод дифференциальной импульсной вольтамперометрии (ДИВА) и спектроскопии электрохимического импеданса (СЭХИ). Сенсор на основе вертикальных углеродных нанотрубок позволяет различать конформацию белков. Кальмодулин связывает ион Ca^{2+} , при этом происходит увеличение содержания α -спиральных участков белка. Импринтированный для комплекса Ca^{2+} -кальмодулин наносенсор различает индуцированные ионом Ca^{2+} конформационные изменения кальмодулина, что отражается на разнице в константах диссоциации свободного и Ca^{2+} -связанного белка.

Основные подходы для электроанализа белков и МИП-сенсоров заключаются в использовании так называемых “внешних” электроактивных индикаторов, таких, как феррицианид калия. Пик восстановления Fe^{3+} регистрируют методом циклической вольтамперометрии, дифференциальной импульсной вольтамперометрии (ДИВА), квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВА) и методом спектроскопии электрохимического импеданса.

Для анализа белков и полимеров с молекулярными отпечатками на основе акриламидных гидрогелей был использован математический анализ электрохимических параметров с использованием метода главных компонент (principal component analysis, PCA) [43]. Авторы проанализировали 4 электрохимических параметра E_p , I_p , $E_{1/2}$, $I_{\text{при } -0,8 \text{ В}}$, $\Delta I_{\text{при } -0,8 \text{ В}}$ для гемоглобина быка, бычьего сывороточного альбумина, цитохрома *c*, и миоглобина лошади, встроенных в соответствующий МИП. Потенциал $0,8 \text{ В}$ был выбран как потенциал восстановления кислорода на электродах, модифицированных МИП и соответствующими белками. С помощью метода главных компонент авторам удалось провести основанное на МИП электрохимическое профилирование исследуемых белков и выявить специфичность полученных МИП-сенсоров. Для белков с большей массой (гемоглобин быка, бычий сывороточный альбумин)

эффективность связывания МИП-сенсора по сравнению с НИП-сенсором была выше по сравнению с белками с меньшей массой (цитохром *c*, и миоглобин лошади). Авторы показали, что электроанализ может быть проведён при прямой регистрации белков, встроенных в полимер с молекулярными отпечатками. Для белков, не содержащих электроактивную простетическую группу (альбумин), авторы использовали потенциал восстановления кислорода. Авторы предложили использовать такой электрохимический анализ белков, встроенных в МИП, по нескольким электрохимическим параметрам. Это позволило проводить профилирование белков (MIP-based electrochemical protein profiling) с помощью полученных МИП.

В наших исследованиях были получены полимеры с молекулярными отпечатками для миоглобина. В качестве мономера был использован *o*-фенилендиамин. Сенсорным элементом был графитовый электрод, полученный методом трафаретной печати. При электрополимеризации *o*-фенилендиамина в присутствии миоглобина были проанализированы различные соотношения мономер – шаблон (1:1, 1:10, 1:20, 1:100). Наилучшие результаты имеет МИП, полученный при соотношении 1:10 ($1 \times 10^{-6} \text{ М}$ миоглобин : $10 \times 10^{-6} \text{ М}$ *o*-фенилендиамин). Полимер без шаблона (НИП) был получен аналогично. Анализ связывания миоглобина с МИП и оценка распознавательной способности полимера по отношению к миоглобину проводили методом КВВА при прямой электрохимической регистрации миоглобина по пику восстановления Fe^{3+} гемопротеина (рис. 3).

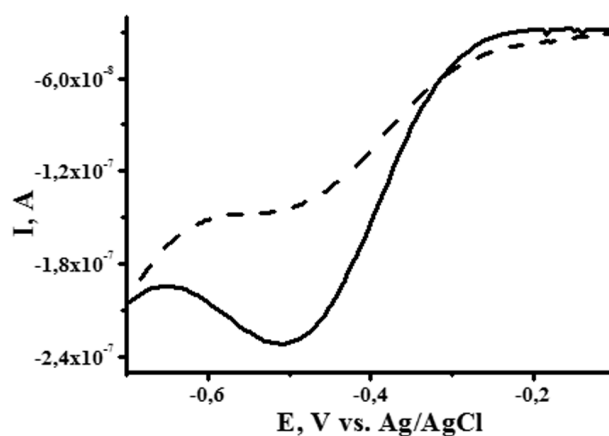


Рисунок 3. КВВА (восстановительный пик) электродов, модифицированных МИП (—) и НИП (---) после инкубации с миоглобином (2×10^{-13} моль/электрод) и стадии отмывки для удаления неспецифической сорбции. Диапазон развёртки потенциала от $-0,7$ до $+0,1 \text{ В}$ (относительно Ag/AgCl), $v=50 \text{ мВ/с}$, частота 10 Гц , амплитуда 20 мВ и шаг 5 мВ .

Ранее в наших исследованиях был разработан электрохимический метод прямой регистрации миоглобина в водных буферных растворах и в плазме крови здоровых доноров и больных острым инфарктом миокарда с помощью

планарных электродов с графитовым рабочим электродом, модифицированным наночастицами золота и мембраноподобным поверхностно активным соединением диметилдидодециламмоний бромидом (ДДАБ) [45]. Специфичность анализа определялась использованием антител к миоглобину. Сенсоры имели диапазон рабочих концентраций от 10 до 1780 нг/мл, (0,56-100 нМ) с пределом определяемых концентраций 10 нг/мл (0,56 нМ). Полученные в данном исследовании МИП-сенсоры имеют более широкий диапазон определяемых концентраций: 10^{-5} - 10^{-9} М, с нижним пределом 0,5 нМ (9 нг/мл) для МИП-сенсоров, сравнимым с чувствительностью иммуносенсоров. Концентрация миоглобина 100 нг/мл (5,6 нМ) является критической при диагностике инфаркта миокарда [38]. Разработанные МИП-сенсоры конкурентоспособны по отношению к иммуносенсорам, и могут быть использованы для анализа плазмы крови больных острым инфарктом миокарда. Преимуществом МИП-сенсоров на основе *o*-фенилендиамина является возможность прямой электрохимической регистрации миоглобина с помощью метода КВВА по интенсивности пика восстановления гемопротейна.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре представлен анализ литературных данных последних лет, в которых обсуждаются экспериментальные результаты по созданию биораспознающих молекул на основе полимеров с молекулярными отпечатками (МИП) для анализа белков электрохимическими методами. Анализ литературы позволяет заключить, что молекулярный импринтинг является бурно развивающейся областью знаний в биосенсорном анализе, электрохимии, в химии полимеров, в синтезе нанокомпозитных материалов. Разрабатываются МИП-сенсоры для анализа нуклеотидов и комплементарных взаимодействий гетероциклических оснований, для моделирования активных центров ферментов, для распознавания вирусов и бактерий. Получение отпечатков микроорганизмов относится к области макромолекулярного дизайна МИП ("macromolecular fingerprints") [46]. Анализ получения МИП для макромолекул тестируется с помощью атомной силовой и сканирующей электронной микроскопии, а также с помощью наногравиметрии. Разработаны МИП-сенсоры, позволяющие различить граммотрицательные (*E. coli* и *Pseudomonas aeruginosa*) и грамположительные (*Bacillus subtilis* и *Staphylococcus aureus*) бактерии. Преимуществами полимеров с молекулярными отпечатками является их стабильность, экономичность синтеза, а также возможность использования различных методов анализа биологических молекул. Однако, в разработке МИП остается ещё много нерешённых проблем, связанных со специфичностью биораспознавания, с методами удаления молекулы-шаблона при сохранении структуры полимера, с чувствительностью анализа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках соглашения №14.576.21.0045 (уникальный идентификатор RFMEFI57614X0045).

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A., Ivanov Yu., Lisitsa A., Zgoda V. (2009) Proteomics, **9**, 1326-1343.
2. Деев С.М., Лебедеенко Е.Н. (2009) Acta Naturae, **1**, 32-50.
3. Barié N., Rapp M. (2001) Biosens. Bioelectron., **16**, 979-987.
4. Петровская Л.Е., Шингарова Д.А., Долгих М.П., Кирпичников. (2011) Биоорган. химия, **37**, 581-591.
5. Radom F., Jurek P.M., Mazurek M.P., Otlewski J., Jeleń F. (2013) Biotechnol. Advances, **31**, 1260-1274.
6. Radko S., Rakhmetova S., Bodoev N., Archakov A. (2007) Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry, **1**, 198-209.
7. Спиридонова В.А. (2010) Биомед. химия, **56**, 639-656.
8. Щербинин Д.С., Веселовский А.В. (2013) Биофизика, **58**, 415-424.
9. Гендриксон О.Д., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. (2006) Успехи биологической химии, **46**, 149-192.
10. Li S., Cao S., Whicombe M., Piletsky S. (2014) Progress in Polymer Science, **39**, 145-163.
11. Polyakov M.V. (1931) Zhur. Fiz. Khim., **2**, 799-805.
12. Polyakov M.V., Kuleshina L., Neimark I. (1937) Zhur. Fiz. Khim., **10**, 100-112.
13. Dickey F.H. (1949) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **35**, 227-229.
14. Pauling L. (1940) J. Am. Chem. Soc., **62**, 2643-2657.
15. Wulff G., Sarhan A. (1972) Angew. Chem. Int. Ed., **11**, 341-348.
16. Yaqub S., Latif U., Dickert F.L. (2011) Sensors and Actuators B, **160**, 227-233.
17. Verheyen E., Schillemans J.P., van Wijk M., Demeniex M.A., Hennink W.E., van Nostrum C.F. (2011) Biomaterials, **32**, 3008-3020.
18. Lieberzeit P.A., Glanznig G., Jenik M., Gazda-Miarecka S., Dickert F.L., Leidl A. (2005) Sensors, **5**, 509-518.
19. Kima J.-M., Leea U.-H., Changa S.-M., Park J.Y. (2014) Sensors and Actuators B, **200**, 25-30.
20. Liu R., Sha M., Jiang S., Luo J., Liu X. (2014) Talanta, **120**, 76-83.
21. Yola M.L., Uzun L., Özaltın N., Denizli A. (2014) Talanta, **120**, 318-324.
22. Cai D., Ren L., Zhao H., Xu C., Zhang L., Yu Y., Wang H., Lan Y., Roberts M.F., Chuang J.H., Naughton M.J., Ren Z., Chiles T.C. (2010) Nat. Nanotechnol., **5**, 597-601.
23. Lv Y. (2013) Biotechnol. Advances, **31**, 1172-1186.
24. Moreira F.T., Dutra R.A., Noronha J.P., Sales M.G. (2011) Biosens. Bioelectron., **26**, 4760-4766.
25. Li W.K., Li S.J. (2007) Adv. Polym. Sci., **206**, 191-210.
26. Kim J.-M., Lee U.-H., Chang S.-M., Park J.Y. (2014) Sensors and Actuators B, **200**, 25-30.
27. Malitesta C., Mazzotta E., Picca R.A., Poma A., Chianella I., Piletsky S.A. (2012) Anal Bioanal. Chem., **402**, 1827-1846.
28. Zhang X., Peng Y., Bai J., Ning B., Sun S., Hong X., Liu Y., Liu Y., Gao Z. (2014) Sensors and Actuators B, **200**, 69-75.
29. Tuyen D., Quan D., Binh N., Nguyen V., Lam T., Huyen L., Nguen L., Viet P., Loc N., Huy T. (2014) J. Mol. Liquids, **198**, 307-312.

30. Luo J., Jiang S., Liu X. (2014) *Sensors and Actuators B*, **203**, 782-789.
31. Choong C.L., Bendall J.S., Milne W.I. (2009) *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 652-656.
32. Liu Y., Kumar S. (2014) *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **6**, 6069-6087.
33. Matsunaga T., Hishiya T., Takeuchi T. (2007) *Anal. Chim. Acta*, **591**, 63-67.
34. Kimhi O., Bianco-Peled H. (2007) *Langmuir*, **23**, 6329-6335.
35. Hawkins D.M., Stevenson D., Reddy S.M. (2005) *Anal. Chim. Acta*, **542**, 61-65.
36. Wang Y., Wei T.-X. (2013) *Chem. Lett.*, **24**, 813-816.
37. Qureshi A., Gurbuz Y., Niazi J.H. (2012) *Sensors and Actuators B-Chemical*, **171**, 62-76.
38. Mohammed M., Desmulliez M. (2011) *Lab. Chip*, **11**, 569-595.
39. McDonnell B., Hearty S., Leonard P., O'Kennedy R. (2009) *Clin Biochem.*, **42**, 549-561.
40. Karimian N., Vagin M., Hossein M., Zavar A., Chamsaz M., Turner A., Tiwari A. (2013) *Biosens. Bioelectron.*, **50**, 492-498.
41. Karimian N., Turner A., Tiwari A. (2014) *Biosens. Bioelectron.*, **59**, 160-165.
42. Moreira F., Sharma S., Dutra R., Noronha J., Cass A., Sales M. (2013) *Biosens. Bioelectron.*, **45**, 237-244.
43. Moreira F., Sharma S., Dutra R., Noronha J., Cass A., Sales M. (2014) *Sensors and Actuators B*, **196**, 123-132.
44. Bueno L., El-Sharif H.F., Salles M.O., Boehm R.D., Narayan R.J., Paixão T.R.L.C., Reddy S.M. (2014) *Sensors and Actuators B*, **204**, 88-95.
45. Шумянцева В.В., Булко Т.В., Супрун Е.В., Кузиков А.В., Агафонова Л.Е., Арчаков А.И. (2015) *Биомед. химия*, **61**, 185-204.
46. Sharma P., Iskierko Z., Pietrzyk-Le A., D'Souza F., Kutner W. (2015) *Electrochemistry Communications*, **50**, 81-87.

Поступила: 17.11.2015.

MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS IN ELECTRO ANALYSIS OF PROTEINS

V.V. Shumyantseva^{1,2}, T.V. Bulko^{1,2}, L.E. Baychorov², A.I. Archakov²

¹IBMC-EcoBioPharm Company, Moscow 119121, Russia

²Institute of Biomedical Chemistry, 10 Pogodinskaya str., Moscow 119121, Russia

In the review the main approaches to creation of recognition materials capable of competing with biological specific receptors, (polymeric analogs of antibodies or molecularly imprinted polymers, MIP) for the electro analysis of functionally significant proteins such as a myoglobin, troponin T, albumin, human ferritin, calmodulin are considered. The main types of monomers for MIP fabrication, and methods for MIP/protein interactions, such as a surface plasmon resonance (SPR), nanogravimetry with use of the quartz crystal resonator (QCM), spectral and electrochemical methods are discussed. Experimental data on electrochemical registration of a myoglobin using MIP/electrode are presented. For a development of electrochemical sensor systems based on MIPs, *o*-phenylenediamine (1,2-diaminobenzene) was used as a monomer. It was shown that the imprinting factor $I_{\max}(\text{MIP})/I_{\max}(\text{NIP})$, calculated as a myoglobin signal ratio when embedding in MIP to a myoglobin signal when embedding in the polymer received without molecular template (NIP) corresponds 2-4.

Key words: molecularly imprinting, molecularly imprinted polymers (MIP), nanomaterials, electroanalysis, electrochemical sensors, MIP sensor, proteins.