

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

на правах рукописи

Капустин Дмитрий Валерьевич

**ФТОРПОЛИМЕР- И ПОИАНИЛИНСОДЕРЖАЩИЕ КОМПОЗИТЫ
КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ
БИОТЕХНОЛОГИИ**

Специальности: 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии),
02.00.06 - высокомолекулярные соединения

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва – 2020 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный консультант:

доктор химических наук, профессор

Зубов Виталий Павлович

Официальные оппоненты:

член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор

Костров Сергей Викторович, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики РАН

член-корреспондент РАН, доктор химических наук, профессор

Ярославов Александр Анатольевич, зав. кафедрой высокомолекулярных соединений Химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ)

доктор биологических наук, профессор

Лунин Владимир Глебович, зав. лабораторией биологически активных наноструктур отдела генетики и молекулярной биологии бактерий Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ («НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»)

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» (РХТУ им. Д.И. Менделеева)

Защита состоится 17 июня 2020 г. в 10 часов на заседании Диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат диссертации разослан « _____ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

Доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Развитие биотехнологии во многом обусловлено использованием технологии рекомбинантных ДНК, обеспечившей создание новых микроорганизмов и эукариотических клеток, производящих важные биологически активные соединения. В результате возникла *молекулярная биотехнология* – дисциплина, в рамках которой разрабатываются эффективные способы получения биополимеров (нуклеиновых кислот и белков) с заданными свойствами, вакцины, а также методы *молекулярной диагностики* инфекционных и генетических заболеваний. Успехи молекулярной диагностики в значительной мере определяются открытием *полимеразной цепной реакции (ПЦР)* - процесса искусственного многократного копирования ДНК. ПЦР-анализ - высокочувствительный и селективный метод, однако серьезной проблемой в ПЦР-диагностике остается выбор конкретного способа подготовки материала к исследованию, поскольку до сих пор не был известен материал, позволяющий одинаково эффективно выделять удовлетворительно очищенные нуклеиновые кислоты (НК) разных классов организмов из различных биологических источников (проб). Сказанное относится и к выделению белков, поскольку присутствие примесей в выделенном образце может существенно снизить эффективность их применения в биоинженерии, медицинской диагностике или в качестве компонентов лекарственных средств.

В результате совершенствования *омиксных технологий* к протоколам пробоподготовки образцов предъявляются дополнительные требования, которые ранее ограничивались, в основном, количественным выходом и степенью очистки выделяемого биополимера. Сегодня необходимо также учитывать экономию времени за счет сокращения числа этапов выделения, обеспечивать простоту аппаратного оформления самой процедуры, ее миниатюризацию и возможность роботизации.

Методы выделения биополимеров из биологических смесей основаны на специфических различиях в растворимости (и в сродстве к сорбенту) выделяемых соединений и прочих компонентов смеси и включают жидкостную экстракцию, осаждение и адсорбцию с использованием различных сорбентов. Известные методы многостадийны, трудоемки и часто сопровождаются потерями выделяемого компонента. Методы с применением сорбентов (хроматография, твердофазная экстракция) основаны на концепции «улавливания» и удерживания целевого биополимера сорбентом на первом этапе разделения («*позитивная селекция*»); вслед за этим необходимо смыть ненужные компоненты смеси и элюировать целевой компонент с поверхности (или из объема пор) сорбента. Такой многостадийный механизм широко применяется на практике, несмотря на то, что каждый этап выделения сопровождается потерями выделяемого компонента и не всегда достигается количественное воспроизведение результата. Очевидна актуальность разработки материалов и методологии, позволяющих реализовать

одностадийную схему выделения целевого компонента смеси, в результате чего выделяемый (и очищаемый) биополимер после нанесения биологической смеси на сорбент, не удерживаясь, выходит в исключенном объеме («*негативная селекция*»), а прочие компоненты удерживаются сорбентом.

На момент постановки задачи исследования (2000 г.) было известно, что перфторполимерсодержащие сорбенты не удерживают ДНК, слабо удерживают РНК и обратимо удерживают белки. Аналогичные свойства материалов, модифицированных частично фторированными полимерами, еще не были продемонстрированы. Также было показано, что в результате полимеризации анилина в присутствии твердых подложек на их поверхности формируются полианилиновые (ПАНИ) покрытия, селективные в отношении сорбции различных заряженных ионов и молекул. Была установлена возможность направленного изменения структуры поверхностного слоя ПАНИ-покрытия и, по-видимому, его сорбционных свойств в результате изменения состава среды. Однако ПАНИ-модифицированные материалы еще не применяли для разделения компонентов смесей биополимеров. В клинической практике широко применяли ПЦР-диагностику, но не были известны протоколы пробоподготовки для выделения НК, основанные на «*негативной селекции*».

В силу своих физико-химических свойств фторполимеры (ФП) и полианилины не пригодны для получения пористых сорбентов с удовлетворительными прочностными и морфологическими характеристиками. Решение найдено в получении композитов, сочетающих жесткость и контролируруемую пористость твердой подложки с уникальными сорбционными свойствами полимерного нанопокрывания, получаемого на поверхности носителя. Необходимо разработать соответствующие технологии, в том числе *прямой синтез* наноструктурированных композитов, а также оптимальные конструкции *биосепарирующих элементов* (БЭ) - как альтернативу хроматографическим колонкам, в частности, одноразовых картриджей с дисперсным сорбентом и устройств, содержащих в зависимости от состава пробы и назначения биополимера полимермодифицированные капилляры, мембраны, пластины и др. Не менее актуальна разработка оптимальных протоколов пробоподготовки для выделения биополимеров из различных источников с помощью разрабатываемых БЭ с целью достижения заданных параметров выделения (выход, степень очистки, число манипуляций, затрачиваемое время).

Таким образом, имелись предпосылки для разработки эффективных и технологичных способов получения полимерсодержащих композитов, обеспечивающих «*негативную селекцию*» при выделении НК из сложных биологических смесей с целью разработки эффективных одностадийных протоколов выделения НК для молекулярной диагностики с одновременной возможностью разделения компонентов белковой фракции. В результате исследования предстояло определить круг полимеров, которые в отношении биологических молекул демонстрируют сорбционные свойства, присущие перфторматериалам, и могут быть использованы для решения указанных задач. Также представлялось важным оценить эффективность применения новых

наноструктурированных композитов, проявляющих различную селективность к разным классам биополимеров, в биоаналитике и в смежных областях молекулярной биотехнологии. Все это определило актуальность и новизну проведенного исследования.

Научное направление исследования: разработка научных принципов получения наноструктурированных полимерсодержащих систем для одностадийного выделения ДНК из биологических образцов и методологии их практического применения.

Цель работы состояла в разработке масштабируемых технологий синтеза композиционных сорбентов, модифицированных ФП и ПАНИ; в получении на основе различных носителей серии сорбентов, демонстрирующих *«негативную селекцию»* в отношении НК; в исследовании физико-химических, сорбционных свойств полученных сорбентов, механизмов сорбции биомакромолекул на этих сорбентах; в разработке эффективных протоколов их применения для одностадийного выделения НК из биологических смесей, для разделения белковых смесей, в качестве рабочих тел в биоаналитике и при синтезе фрагментов НК.

Для достижения указанной цели необходимо решить следующие **задачи**:

- исследовать сорбционные свойства ФП- и ПАНИ-содержащих композитов в условиях разделения компонентов биологических смесей с целью определения факторов, определяющих механизм сорбции биополимеров на поверхности получаемых сорбентов, в том числе с использованием полиарамидов, содержащих набор структурных элементов (ароматический азот, фтор, а также донорные и акцепторные фрагменты), моделирующих свойства ФП и ПАНИ;
- разработать технологичные способы синтеза ФП- и ПАНИ-содержащих сорбентов, в частности, путем локализации процесса полимеризации на поверхности твердых носителей различной природы (дисперсные частицы, мультикапилляры, мембраны и др.);
- разработать воспроизводимые протоколы пробоподготовки с применением полученных сорбентов для выделения НК и белков, основанные на *«негативной селекции»* в отношении НК;
- подтвердить универсальность разработанных материалов и эффективность их применения в пробоподготовке для ПЦР-диагностики на примерах выделения НК из проб, различающихся по происхождению (вирусы, прокариоты, эукариоты), типу (бактериальные культуры, биологические жидкости, ткани грибов, растений и животных, почвенные экстракты, пищевые продукты) и способу подготовки (лизаты, экстракты, фильтраты, смывы);
- продемонстрировать эффективность разработанных материалов на примерах использования в биоаналитике (в качестве сорбентов для жидкостной хроматографии, в качестве рабочих тел в масс-спектрометрии, сорбентов для экстракции производных витаминов из крови) и в качестве носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов.

Научная новизна. Впервые обнаружен и исследован эффект низкой сорбционной активности ряда полимеров (фторполимеры, полианилины, полиарамида) по отношению к НК («негативная селекция») при одновременной их высокой сорбционной активности по отношению к белкам («позитивная селекция»). Исследованы сорбционные свойства ФП-, ПАНИ- и полиарамида содержащих композитов в отношении ДНК, РНК и белков в режиме статической и динамической сорбции; установлены факторы, определяющие механизмы сорбции биополимеров на поверхности полученных сорбентов.

На основе обнаруженного эффекта разработаны технологические методы синтеза сорбентов для одностадийного выделения НК из биологических смесей и последующего выделения компонентов белковой фракции. Эти методы основаны на получении нанотолщинных ФП- и ПАНИ-покрытий как на поверхности инертных носителей, так и за счет предварительной активации поверхности с целью локализации полимеризации на поверхности носителей различной природы (дисперсные кремнеземы, стеклянные мультикапилляры, синтетические мембраны, кремниевые пластины и др.). Впервые разработаны способы полимеризации мономеров, полимеризующихся по радикальному или по окислительному механизму (фтормономеры, анилин и др.), на поверхности активированного озоном кремнезема без добавления низкомолекулярных инициаторов или окислителей; способы полимеризации анилина на гидрофобизованном кремнеземе и на предварительно иммобилизованных на кремнеземной поверхности полисульфокислотах.

Экспериментально доказана эффективность применения полученных материалов в составе различных конструкций БЭ (спин-картриджи, мультикапиллярные наконечники, мембранные сорбенты), обеспечивающих одностадийное выделение ДНК для ПЦР-диагностики из проб, различающихся по происхождению, источнику и способу подготовки, а также возможность селективного выделения компонентов белковой фракции.

Впервые использовано свойство анилинсодержащих полимеров абсорбировать энергию лазера, облегчая ионизацию молекул аналита при масс-спектрометрии белков и пептидов в формате *лазерной десорбции/ионизации, усиленной поверхностью* без добавления «вещества-матрицы» - абсорбера энергии. На основе указанного свойства и благодаря тому, что такие полимеры селективно удерживают белки (пептиды) в зависимости от их pI , разработана и запатентована эффективная система для масс-спектрометрии пептидов.

Разработан новый носитель на основе кремнезема, модифицированного фторсодержащим полиэфиром с иммобилизованным нуклеозидным остатком для твердофазного синтеза олигонуклеотидов.

Впервые разработан способ одновременного выделения четырех жир- и пяти водорастворимых витаминов из крови человека, включающий этапы жидкофазной и твердофазной экстракции с использованием ФП-модифицированного кремнеземного сорбента, для ВЭЖХ-анализа.

Практическая значимость. Запатентованы способы получения и применения ФП- и ПАНИ-модифицированных сорбентов для одностадийного

выделения ДНК (US 2006/243658 A1, US 7018538 B2, US 2008/0015341A1; US 7772152 B2, патенты РФ № 2547597, 2631934 С1). Изготовлены партии ФП-, ПАНИ- и ФП-ПАНИ-содержащих сорбентов. Разработаны протоколы одностадийного выделения ДНК различного происхождения (вирусная, бактериальная, низших грибов, растительная, животных, человека) из различных источников (лизаты растительной ткани, кровь, мокрота, урогенитальные мазки, пищевые продукты, пробы воздуха и воды, почва). Протоколы выделения ДНК возбудителей гепатита В, урогенитальных инфекций, туберкулеза человека и др. успешно апробированы в лабораториях НМИЦ Гематологии, ЗАО «НПФ Синтол» (г. Москва), ООО «НПФ ГенЛаб» (г. Москва), ФКУЗ «МИКРОБ» (г. Саратов). Разработаны регламенты на опытное производство сорбентов Si-500-ФП-ПАНИ и МФК-ПАНИ для выделения ДНК из клинических проб. Разработан БЭ с ФП-сорбентом и с концентрирующими гранулами для выделения и концентрирования ДНК из лизатов бактериальных спор. Получен и успешно апробирован в компании Proligo GmbH (Германия) ФП-содержащий носитель для твердофазного синтеза олигонуклеотидов. Запатентован способ модифицирования кремниевых пластин и их использования в SELDI-TOF-MS масс-спектрометрии без добавления «вещества-матрицы» (WO 2011004308 A1). Разработан способ одновременного выделения из одного образца крови производных девяти витаминов (водо- и жирорастворимых) с помощью ФП-сорбента для ВЭЖХ-анализа содержания производных витаминов в крови. Свойства разработанных композитов превосходят характеристики известных коммерческих брендов.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Экспериментальное подтверждение эффекта «негативной селекции» по отношению к НК и одновременной «позитивной селекции» по отношению к белкам, проявляющегося при использовании покрытий, полученных на основе частично фторированных полимеров, полианилинов и полиарамидов. Экспериментально установленные факторы, определяющие механизм сорбции НК и белков на поверхности ФП- и ПАНИ-модифицированных сорбентов.

2. Технологичные способы синтеза ФП- и ПАНИ-содержащих композитов многоцелевого назначения, обеспечивающих одностадийное выделение НК из сложных биологических смесей с возможностью последующего выделения отдельных компонентов белковой фракции.

3. Способы активации поверхности кремнеземов с целью локализации формирования ФП- и ПАНИ-покрытий на поверхности носителя, включающие сульфирование привитой полимерной фазы, иммобилизацию поликомплексов ПАНИ с полисульфокислотами, гидрофобизацию поверхности покрытием фторполимера, а также активацию поверхности кремнезема озоном, в результате чего образуются активные центры, инициирующие как радикальную, так и окислительную полимеризацию мономеров. Способ введения в состав получаемого полимерного покрытия функциональных групп с целью изменения полярности поверхности и селективности получаемых сорбентов при разделении смесей НК с различной вторичной структурой.

4. Биосепарирующие элементы, содержащие разработанные композиты.

5. Экспериментальное подтверждение эффективности использования разработанных биосепарирующих элементов при одностадийном выделении ДНК из различных организмов (вирусы, бактерии, грибы, растения, животные, человек) из различных источников (лизаты бактериальных культур, растительной ткани, крови, мокроты, урогенитальных мазков, пищевых продуктов, почвенные экстракты), в ПЦР-диагностике патогенов человека (вирусных, бактериальных, дрожжевых инфекций, а также социально опасных инфекций, таких как гепатит В и туберкулез) и фитопатогенов.

6. Способ получения покрытий на основе сополимеров анилина с замещенными анилинами на поверхности кремниевых пластин и результаты применения полученных материалов, доказывающие возможность обогащения белково/пептидной пробы целевым анализом на поверхности полученного покрытия и проведение масс-спектрометрического анализа непосредственно на полученных пластинах без добавления абсорберов лазерной энергии.

7. Эффективные протоколы очистки ПЦР-продуктов от примесей с помощью полученных ПАНИ-содержащих сорбентов.

8. Способ пробоподготовки, обеспечивающий одновременное выделение из одного образца крови производных пяти водо- и четырех жирорастворимых витаминов с использованием кремнеземного ФП-сорбента для ВЭЖХ-анализа содержания производных витаминов в крови.

Апробация работы. Основные результаты диссертации доложены на 40 российских и 26 международных симпозиумах и конференциях: 18th International Symposium on Column Liquid Chromatography (Minneapolis, USA, 1993 г.), Third International Symposium on Bioorganic Chemistry (Дагомыс, Россия, 1995 г.), VII всероссийском симпозиуме по молекулярной жидкостной хроматографии (Москва, 1996 г.), конференциях «Фундаментальные проблемы науки о полимерах» (Москва, 1997 г.) и «Фармацевтическая биоэтика» (Москва, 1997 г.), на Зимних международных научных школах «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва – 1997, 2004, 2005, 2008, 2016, 2017 г.г.), ICT-Workshop Biotechnology (Wiesbaden, Germany, 1999 г.), 17th DECHEMA Annual Meeting on Biotechnology (Wiesbaden, Germany, 1999 г.), Всероссийском каргинском симпозиуме «Химия и физика полимеров в начале XXI века» (Черноголовка, 2000 г.), на чтениях, посвященных памяти академика Ю.А. Овчинникова «Биоорганика» (Москва, Пущино - 2000, 2002, 2006 г.г.), Humboldtian Conference - Biomedical Science 2001 (Moscow, 2001 г.), Malaysian-Russian Seminar on Bioorganic Chemistry (Moscow, 2002 г.), III съезде биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002 г.), 22 International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides (Heidelberg, Germany, 2002 г.), Международной конференции по физико-химической биологии, посвященной 70-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2004 г.), Международной научно-технической конференции «Наука и образование – 2005» (Мурманск, 2005 г.), 1st and 2nd NACBO International Nanobiotechnology Conference (Urbino, Italy, 2006

г., Roma, Italy, 2009 г.), Всероссийской Каргинской Конференции “Наука о полимерах 21-ому веку” (Москва – 2007, 2010, 2014, 2017 г.г.), EPF-2007 (Portoroz, Slovenia, 2007 г.), XVIII менделеевском съезде по общей и прикладной химии (Москва, 2007 г.), DIAGNOSIS 2nd International Conference (Tel Aviv, Israel, 2008 г.), XVI международной конференция и дискуссионном научном клубе «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии (IT + M&Ec’ 2008)» (Ялта-Гурзуф, Украина, 2008 г.), III International Conference on Colloid Chemistry and Physicochemical Mechanics (Москва, 2008 г.), Международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 75-летию со дня рождения академика Ю. А. Овчинникова (Москва – Пущино, 2009 г.), ESBES + ISPPP + ISB Symposia - DECHEMA (Bologna, Italy, 2010 г.), Международном конкурсе научных работ молодых ученых в области нанотехнологий (Москва, 2010 г.), European Polymer Congress (EPF 2011), XII GEP Congress (Granada, Spain, 2011 г.), EUPOC 2011 – Biobased polymers and related biomaterials (Gargnano, Italy, 2011 г.), Second International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials (Strasbourg, France, 2011 г.), Zing Conferences - Polymer Chemistry Conference (Cancun, Mexico, 2012 г.), VII московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013 г.), Международной конференции, посвящённой 55-летию ИБХ РАН и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2014 г.), IV Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» (Краснодар, 2014 г.), I Всероссийской конференции «Химический анализ и медицина» (Москва, 2015 г.), VI бакеевской всероссийской с международным участием школе-конференции для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты» (Москва, 2016 г.), III Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, Россия, 2017 г.), BIT’s 7-th Annual World Congress of Nano Science & Technology-2017 (Fukuoka, Japan, 2017). Седьмой всероссийской каргинской конференции «Полимеры - 2017» (Москва, 2017 г.), XXVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва, 2019 г.).

Наборы для пробоподготовки бактериальной ДНК на основе разработанных сорбентов использовали в лабораторном студенческом практикуме, выполняемом на базе Учебно-научного центра ИБХ РАН. Разработанные наборы для одностадийного выделения ДНК переданы в НМИЦ Гематологии, ЗАО «НПФ Синтол», ООО «ГенЛаб», где подтверждена их высокая эффективность по сравнению со стандартными многостадийными методиками, в частности, при выделении ДНК возбудителей гепатита В, бактериальных и грибковых урогенитальных инфекций и туберкулеза человека. В АНО «Центр Биотической Медицины» (Россия) разработаны методические рекомендации «Определение витаминов в цельной крови человека методом твердофазной экстракции с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ТФЭ-ВЭЖХ)» с использованием разработанного ФП-содержащего сорбента.

Результаты работы использованы при выполнении гранта МНТЦ № 1233 (2003-2005 г.г.); договоров между ИБХ РАН и АНО «Центр биотической медицины» (2007–2009 г.г.); государственного контракта Министерства обороны РФ 2/01-07/ИБХ (шифр «Испарение-1-ИБХ) (2007–2008 г.г.); договора № 55 между ИБХ РАН и ООО НПП «Наноструктурированная технология стекла» (г. Саратов), 2013-2014 г.г.; проектов 6-ой рамочной программы Евросоюза NACBO (NMP4-CT-2004-500804, 2004–2009 г.г.) и DIAGNOSIS (LSNB-CT-2006-037212, 2007–2010 г.г.) и др.

Личный вклад автора. Автору принадлежит решающая роль на всех этапах - от выбора направления, постановки задач, планирования и проведения исследований - до анализа, обобщения полученных результатов, их внедрения, а также литературного оформления и публикации в научных изданиях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано более 90 работ, в том числе, 19 статей, 1 глава в монографии, 7 патентов, 66 тезисов докладов на российских и международных конференциях, методические указания и 2 технологических регламента.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа включает введение, пять глав, выводы, библиографический список (439 наименований) и изложена на 382 страницах, содержит 36 таблиц и 127 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Методы пробоподготовки биологических образцов для выделения нуклеиновых кислот; применяемые носители, сорбенты и полимерные модификаторы (обзор литературы).

Рассмотрены методы подготовки биологических образцов к выделению биополимеров, в частности, способы выделения НК, включая автоматические системы и микрофлюидные устройства. Проиллюстрировано становление методологии синтеза композиционных сорбентов для разделения смесей биополимеров. Прочитрованы работы, посвященные получению полимерсодержащих сорбентов в результате физической сорбции и хемосорбции полимеров на поверхности носителей. Особое внимание уделено фторполимерсодержащим материалам. Проведен анализ свойств кремнеземов (широко применяемых носителей), а также таких перспективных носителей, как мультикапилляры и синтетические мембраны. Проанализированы факторы, ограничивающие применимость конкретных материалов для выделения биополимеров. Рассмотрены требования, предъявляемые к полимерным модификаторам сорбентов и к условиям синтеза композитов. Перечислены важнейшие свойства композиционных сорбентов, обсуждены потенциальные технологические проблемы при их получении, а также пути их решения. Отдельно рассмотрены работы, посвященные строению ПАНИ и особенностям его синтеза в качестве перспективного модификатора при создании композиционных сорбентов для разделения смесей биополимеров. Показано,

что применяемые для выделения НК методы многостадийны, а материалы, демонстрирующие эффект «*негативной селекции*» в отношении НК, не разработаны (за исключением ПТФЭ-содержащих кремнеземов, получаемых ресурсозатратным радиационным методом).

Глава 2. Объекты и методы исследования, использованная аппаратура, разработанные методики синтеза сорбентов и протоколы выделения биологически активных соединений.

В работе использовали неорганические и органические носители. Кремнеземы применяли благодаря их жесткости, контролируемой пористости и развитой поверхности. Картриджи с дисперсными объемно-пористыми сорбентами оказались оптимальными для выделения ДНК из большинства проб. Выбор других носителей продиктован свойствами образца, из которого следовало выделять НК. Так, для выделения ДНК особо опасных патогенов подходили полимермодифицированные мультикапиллярные наконечники. БЭ, содержащие кроме селективного сорбента слой концентрирующих гранул, использовали в пробоподготовке образцов с низким содержанием ДНК. Мембранные сорбенты эффективны при выделении ДНК из проб с высоким содержанием бактериальных возбудителей, а также при выделении вирусных частиц. При синтезе олигонуклеотидов использовали дисперсные носители; при масс-спектрометрии белковых анализов – полимермодифицированные кремниевые пластины.

Поверхность носителей модифицировали политетрафторэтиленом, сополимерами тетрафторэтилена (с гексафорпропиленом, аллиламином, аллиловым спиртом), полифторбутадиеном, полианилином, полиарамидами, поликомплексами полианилина с полисульфокислотами, сополимерами анилина с замещенными анилинами, частично фторированными полиэфирами. Полимерные модификаторы синтезировали методами радикальной, радиационной прививочной или окислительной полимеризации, а также проводя полимераналогичные превращения с прекурсорами, полученными методом «кастинга». Синтез композитов осуществляли в присутствии неактивированных или активированных носителей.

В исследовании использовали ртутную порометрию, элементный анализ, РФЭС, ВЭЖХ, УФ- и ИК-спектроскопию, оптическую микроскопию, сканирующую зондовую микроскопию, электрофоретические методы, лазерную корреляционную спектроскопию, метод спектрально-корреляционной интерферометрии, определение ξ -потенциала, рН-метрию, методы химического анализа, ПЦР, масс-спектрометрию, ЭПР. Использовали как модельные растворы НК, белков и их смеси, так и лизаты бактериальных культур, биологических жидкостей (кровь, сыворотка, плазма крови человека и животных, мокрота, уrogenитальные мазки), мицелия грибов, тканей растений, пищевых продуктов, экстрактов почвы и др. для выделения биополимеров из вирусов, бактерий и эукариот.

Глава 3. исследование сорбционных свойств полиарамид-, фторполимер- и ПАНИ-содержащих сорбентов.

В основу исследования положено предположение о том, что эффект «негативной селекции» в отношении НК может проявляться при использовании не только перфторированных, но также частично фторированных и не содержащих фтор полимеров, в частности, ПАНИ, а возможно и других синтетических полимеров. Следовало изучить факторы, определяющие механизм сорбции биомакромолекул на поверхности исследуемых полимерных покрытий, в частности, оценить влияние морфологии и химического строения поверхностных слоев этих покрытий.

3.1. Сходство и различия в сорбционных свойствах фторполимерных и ПАНИ-покрытий. Эффект «негативной селекции» в отношении НК легко проиллюстрировать результатами использования ВЭЖХ-колонок, упакованных ПТФЭ- и ПАНИ-содержащими кремнеземными сорбентами для разделения смеси плазмиды pBR 322 из *E. Coli*, РНК и сопутствующих белков. Было известно, что ДНК с ПТФЭ-колонок выходит в первой фракции в исключенном объеме, в то время как РНК слабо удерживается, но также выходит в изократическом режиме в составе второй фракции. Как оказалось, аналогичный результат достигается и при использовании ПАНИ-модифицированного кремнезема (Рис. 1).

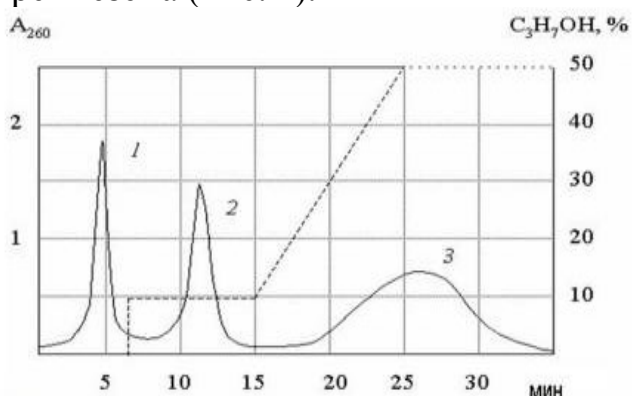


Рисунок 1 - Очистка плазмиды pBR322 от РНК и сопутствующих белков на стеклянной колонке (5 x 150 мм) с МПС-1150-ПАНИ. Использовали хроматограф Beckman Coulter Model 338 (США). Элюент: 0.01М Tris-HCl (рН 8.2). Градиент: а) ступенька - с 6.5 мин 10% изопропанола в течение 8.5 мин, затем б) градиент - 10 - 50% изопропанола за 10 мин. Скорость потока: 110 мкл/мин. 1 - плазмида, 2 - РНК, 3 - белки.

Различия в сорбционном поведении ПТФЭ- и ПАНИ-содержащих сорбентов выявляются при десорбции удерживаемых сорбентами белков. Суммарная белковая фракция полностью десорбируется с ПТФЭ-колонок в обращенно-фазовом режиме в условиях возрастающего градиента концентрации органического растворителя (как и при использовании С18-фаз), когда скорость элюирования белков (пептидов) тем выше, чем ниже их гидрофобность. Напротив, удержанные рН-чувствительным ПАНИ-покрытием молекулы белков выходят с колонок в условиях понижающегося градиента рН в зависимости от значения их изоэлектрической точки (рI), но не молекулярной массы или гидрофобности (Рис. 2).

Таким образом, если на этапе разделения фракций НК и белков перфторполимер- и ПАНИ-композиции демонстрируют сходные сорбционные свойства, то удерживание и последующая десорбция компонентов белковой

3.2.1. Объекты исследования. Высокая сорбционная емкость кремнеземных полимерсодержащих сорбентов позволяет использовать их в составе компактных спин-колонок (картриджей), что обеспечивает низкий расход сорбента (60–150 мг на картридж) и быструю (3-5 мин) биосепарацию (в отличие от методов традиционной колоночной хроматографии). Статическую сорбцию биополимеров исследовали с использованием именно таких спин-колонок с синтезированными сорбентами. Изучая механизмы сорбции биополимеров на полученных материалах и отвечая на вопрос: присущи ли сорбционные свойства перфторполимеров полианилинам и другим классам полимеров, исследовали свойства кремнеземов, модифицированных полиарамидами, содержащими набор таких «ключевых» элементов как ароматический азот, фтор, а также донорные и акцепторные фрагменты. При исследовании динамической сорбции биополимеров в режиме реального времени аналогичные полимерные покрытия наносили методом spin-coating на плоские стеклянные подложки. Свойства полученных покрытий сравнивали со свойствами ФП- и ПАНИ-содержащих сорбентов. Полиарамиды наносили на поверхность стеклянных пластин из их растворов в ТГФ, фторопласт – из его раствора в ацетоне. ПАНИ-покрытия получали методом окислительной осадительной полимеризации анилина на поверхности стеклянных пластин. Химические структуры использованных полимеров приведены на Рис. 3.

3.2.2. Особенности морфологии поверхности полученных полимерных покрытий. Морфологию покрытий на поверхности стеклянных пластин исследовали методом сканирующей зондовой микроскопии. Установлено, что покрытия неравномерны по толщине, а некоторые имеют сквозные или несквозные поры (Табл. 1). По сравнению с полиарамидными покрытиями ФП- и ПАНИ-покрытия имеют относительно ровную поверхность без сквозных пор. В целом, поверхность покрытий, получаемых химическими методами, оказалась значительно более гладкой по сравнению с покрытиями, полученными методом «кастинга».

3.2.3. Химический состав и заряд поверхностного слоя исследуемых полимерных покрытий. С целью подтверждения соответствия реальной химической структуры поверхностных слоев получаемых полимерных нанопокровов их ожидаемому химическому составу покрытия исследовали методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС). Установлено, что для всех образцов теоретически рассчитанные и экспериментально определенные атомные доли С, N, S и F примерно совпадают, различаясь в пределах ошибки метода. Несмотря на различия в морфологии поверхности образцов данные об их химическом составе подтвердили, что химические структуры поверхностных слоев соответствуют брутто-формулам использованных модификаторов. Таким образом, полученные полимерные покрытия пригодны для сравнительного исследования сорбционных свойств в зависимости от химической структуры полимерного модификатора.

В результате определения ξ -потенциалов поверхности частиц полученных сорбентов оказалось, что все исследованные

полиамидсодержащие материалы имеют слабый положительный заряд (1.5 – 5 mV), несколько сильнее он выражен у ФП-материала (10 mV) и у ПАНИ-содержащих сорбентов (30 ± 2 mV), что предполагает наличие у последних слабо выраженных ионообменных свойств. Для удобства сопоставления все полученные данные сведены в Табл. 1.


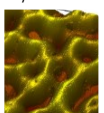
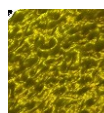
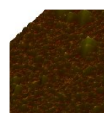
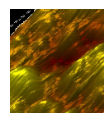
3.3. Сорбционные свойства полимерных покрытий в отношении нуклеиновых кислот и белков. Сорбция растворенного вещества на поверхности может происходить в статических или в динамических условиях. Сорбцию полагали статической, когда растворенные в неподвижной жидкой фазе молекулы удерживаются неподвижным слоем частиц сорбента (в результате контакта компонентов смеси после пропитки неподвижного слоя сорбента аликвотой образца). Тогда *статическая сорбционная активность* сорбента характеризуется количеством удерживаемого вещества на единицу массы сорбента к моменту достижения равновесия при постоянной температуре. Динамическая сорбция происходит при удерживании молекул при пропускании жидкой фазы (раствора биополимера) над исследуемой полимерной поверхностью. *Динамическую сорбционную активность* покрытия в первом приближении можно охарактеризовать временем насыщения формируемого адсорбционного слоя, скорость формирования и толщина которого зависят от свойств поверхности и от природы сорбата.

3.3.1. Удерживание биополимеров полученными сорбентами в режиме статической сорбции. Статическую сорбцию биополимеров на полимерсодержащих кремнеземах исследовали, нанося на картридж с модельным сорбентом (150 мг) аликвоту раствора биополимера или бактериального лизата, полностью смачивая слой сорбента. Картридж выдерживали 3 мин при комнатной температуре, затем получали элюат, центрифугируя картридж при 0.24 kg. Для оценки эффективности выделения ДНК из сложной биологической смеси использовали клеточные лизаты *E. coli* и *Agrobacterium tumefaciens* C58. Отобранные элюаты анализировали спектрофотометрически, электрофоретически и методом ПЦР. Характеристики использованных в исследовании биополимеров представлены в Табл. 2.

Для оценки влияния, которое оказывает предварительное смачивание (уравновешивание) слоя сорбента водой или слабо-солевым буферным раствором на выход НК, аликвоты растворов биополимеров наносили как на сухие картриджи, так и на предварительно смоченные.

Эффект «*негативной селекции*» в отношении двунитевой ДНК (*днДНК*) отмечен для всех материалов, хотя между ними наблюдаются определенные различия (Табл. 1). Так, в группе полиамидсодержащих сорбентов содержание *днДНК* в элюатах (выход ДНК) различается между отдельными образцами (до 15%), а максимальное значение (75% от количества в исходном растворе) отмечено для материалов, полимерные покрытия которых одновременно содержали трифторметильные и электроноакцепторные группы.

Таблица 1 – Характеристики покрытий и сорбционные свойства исследованных сорбентов (численные данные представлены как средние значения \pm SD, n = 3).

Модификатор	РА1	РА7	РА8	РА11	ПТФЭ	ФП	ПАНИ	ФП-ПАНИ
Характеристики полимерного покрытия								
ξ -потенциал, mV	2.1 \pm 0.6	2.3 \pm 0.5	1.6 \pm 0.3	5.3 \pm 0.9	н/о	10.2 \pm 0.6	32.0 \pm 5	30.4 \pm 1
максимальная толщина покрытия, нм	1321.4	316.8	341.2	55.2	н/о	405.3	319.4	1016.7
наличие сквозных пор в покрытии**	+/- 	+/- 	+	-	н/о	- 	- 	- 
** + - сквозные поры, +/- - несквозные поры.								
Удержание биополимеров								
выход ДНК, %	74 \pm 0.5	75 \pm 0.5	60 \pm 0.5	63 \pm 0.5	67 \pm 0.5	65 \pm 0.4	71 \pm 0.5	80 \pm 0.8
выход РНК, %	30 \pm 0.3	30 \pm 0.3	7 \pm 0.2	15 \pm 0.2	2 \pm 0.1	7.0 \pm 0.2	4 \pm 0.1	5 \pm 0.15
Емкость по белку, мг/г сорбента								
БСА	8.0 \pm 0.2	8.0 \pm 0.1	7.0 \pm 0.1	7.0 \pm 0.1	8.0 \pm 0.2	7.0 \pm 0.1	7.0 \pm 0.1	7.0 \pm 0.16
пепсин	7.0 \pm 0.1	6.5 \pm 0.1	7.0 \pm 0.1	7.0 \pm 0.1	7.5 \pm 0.1	7.0 \pm 0.1	6.0 \pm 0.1	6.0 \pm 0.13
цитохром С	8.0 \pm 0.2	8.5 \pm 0.1	7.5 \pm 0.2	7.5 \pm 0.1	8.0 \pm 0.1	8.0 \pm 0.2	9.0 \pm 0.2	9.0 \pm 0.21
лизозим	8.0 \pm 0.2	8.4 \pm 0.1	7.3 \pm 0.2	7.5 \pm 0.1	8.0 \pm 0.2	8.0 \pm 0.1	8.5 \pm 0.2	9.0 \pm 0.20
Отношение выходов ДНК/РНК	2.5	2.5	8.6	4.2	33.5	9.3	17.8	16.0
A ₂₆₀ /A ₂₈₀ (смесь ДНК + БСА)*	1.5	1.7	1.2	1.2	1.5	1.1	1.4	1.9
* A ₂₆₀ /A ₂₈₀ для смеси (ДНК + БСА) составляет 0.9.								
Характеристики динамической сорбции биополимеров								
Продолжительность насыщения адсорбционного слоя, мин:								
БСА	2.0 \pm 0.2	3.0 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2	3.0 \pm 0.2	н/о	н/о	0.8 \pm 0.1	н/о
лизозим	7.0 \pm 0.3	2.0 \pm 0.2	4.0 \pm 0.2	3.0 \pm 0.2	н/о	н/о	0.8 \pm 0.1	н/о
пепсин	-	-	-	-	н/о	н/о	-	н/о
днДНК	-	-	-	-	н/о	н/о	-	н/о
Толщина адсорбционного слоя, нм								
БСА	1.0 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2	2.1 \pm 0.2	н/о	н/о	1.7 \pm 0.2	н/о
лизозим	0.2 \pm 0.1	0.2 \pm 0.1	1.3 \pm 0.2	2.5 \pm 0.2	н/о	н/о	2.1 \pm 0.2	н/о
пепсин	-	-	-	-	н/о	н/о	-	н/о
днДНК	-	-	-	-	н/о	н/о	-	н/о

Высокий выход днДНК (80%) наблюдали для ФП-ПАНИ-сорбента. Увеличить выход днДНК до 99.9% в этом случае удастся, нанося НК-содержащий раствор на предварительно смоченный слой сорбента. Напротив, выход днДНК с ФП-материала оказался на 6 – 18% ниже, чем со всех остальных образцов. Таким образом, выход днДНК достаточно высок при использовании некоторых полиамидов, но ниже, чем при использовании ПАНИ-содержащих сорбентов,

что, тем не менее, подтверждает наличие эффекта «негативной селекции» в отношении *днДНК*.

Таблица 2 - Некоторые характеристики использованных биополимеров.

Биополимер	ММ, кДа	pI	Молярная гидрофобность, кДж/моль
БСА	~ 66.5	4.8	1130
Пепсин	~34.6	2.2	865
Лизоцим	~14.4	11.3	306
Цитохром С	~ 12	10.6	не определено
<i>mРНК</i> из пекарских дрожжей, тип X	~ 25	-	-
ДНК-линейка: смесь фрагментов от 75 до 20 000 п.о.	52 – 13 800 **	-	-
<i>днДНК</i> из <i>E. coli</i>	~2760 (4000 п.о.)*	-	-
<i>днДНК</i> из <i>Agrobacterium tumefaciens C58</i>	~13 800 (20 000 п.о.)*	-	-

** Среднюю молекулярную массу нуклеотида принимали равной 345.

РНК, имеющая в своей структуре как двунитевые, так и одонитевые последовательности, удерживается всеми исследованными сорбентами значительно сильнее, чем *днДНК* - до 70% РНК удерживают материалы РА1 и РА7; РА11- и РА8-сорбенты удерживают 85 и 93% РНК, соответственно. На, ПАНИ- и ФП-ПАНИ-сорбентах удерживается более 95% РНК. ПТФЭ-содержащий материал удерживает РНК практически полностью (98%). При использовании ПАНИ-, ФП-ПАНИ- и ФП-сорбентов в результате последующего нанесения на картриджи, соответственно, по 600, 900 и 1600 мкл нейтрального буфера (или воды), удалось элюировать до 90% удержанной сорбентами РНК.

Результаты электрофореза (Рис. 4) элюатов, полученных после пропускания через картриджи с сорбентами раствора *днДНК*-фрагментов различной длины (от 75 до 2000 п.о.), а также после пропускания бактериального лизата *E. coli*, соответствуют данным Табл. 1. Анализируя представленную электрофореграмму, можно сделать важный вывод: выход удерживаемой ДНК зависит как от химической структуры полимерного модификатора, так и от третичной структуры сорбата, но не от его молекулярной массы (пропорциональной длине цепи макромолекулы, а следовательно, числу возможных точечных контактов с поверхностью сорбента), что является доказательством отсутствия значимого сорбционного взаимодействия ДНК-молекул с исследуемыми полимерными поверхностями.

Как оказалось, полиарамидные покрытия с электроноакцепторными группами (РА1 и РА7) по селективности к паре ДНК - РНК ближе к ПАНИ-содержащим сорбентам, а материалы с электронодонорными фрагментами (РА8 и РА11) – ближе к ФП-содержащему материалу. В то же время, в отличие

от ПАНИ-содержащих материалов, PA8- и PA11-сорбенты не обеспечивают достаточной очистки ДНК от РНК.

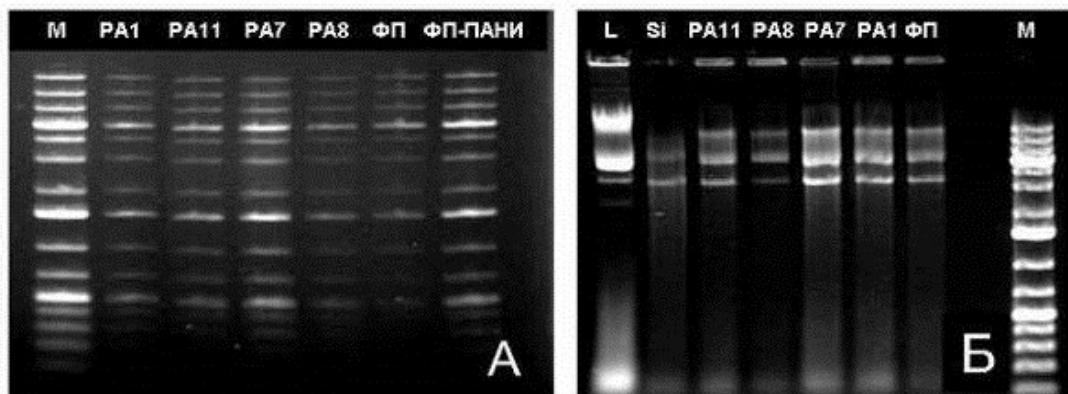


Рисунок 4 - Электрофорез в 0.8% агарозном геле (А) ДНК-фрагментов (1 kb DNA Ladder GeneRuler™ 75 - 20000 bp), содержащихся в полученных элюатах (М - исходный раствор ДНК-фрагментов, 1 мкл в 20 мкл образца, аббревиатуры над треками обозначают полимерный модификатор соответствующего модельного сорбента) и (Б) ДНК, выделенной из *E. coli* (L- лизат *E. coli*, PA11, PA8, PA7, PA1, ФП-ПАНИ - элюаты, полученные с использованием сорбентов, модифицированных соответствующими полиарамидами и ФП, Si - исходный кремнезем, М - маркер ДНК, 1 kb DNA Ladder GeneRuler™ 75 – 20000 bp).

Из данных Табл. 1 видно, что перфторполимер- и ПАНИ-модифицированные сорбенты обеспечивают наиболее высокую степень очистки ДНК от РНК, когда содержание ДНК в элюате более чем в 15 раз превышает содержание РНК (а в случае ПТФЭ-материала - более чем в 30 раз). Таким образом, эффект «негативной селекции» в отношении НК (хотя и в различной степени) демонстрируют как фторполимер- и ПАНИ-содержащие сорбенты, так и материалы, модифицированные полиарамидами с «промежуточной» химической структурой.

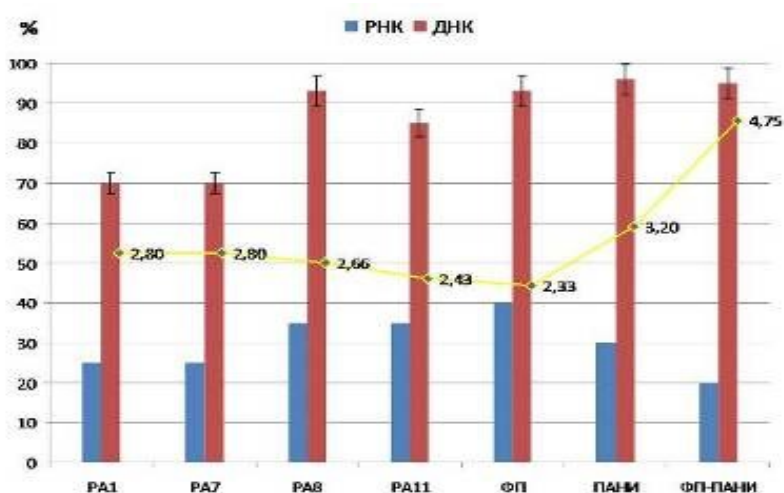


Рисунок 5 - Содержание днДНК и РНК в элюатах, полученных с использованием исследуемых сорбентов. За 100% принято содержание НК в растворе до нанесения на картридж. Для наглядности приведены отношения содержания ДНК и РНК в элюатах для каждого конкретного случая (желтая линия). Смесь НК наносили на сухие картриджи.

В ходе исследования представлялось важным выяснить, насколько степень удерживания белков определяется именно химическим составом полимерного покрытия (а не рельефом поверхности), и ответить на вопрос: какая из характеристик белкового сорбата (молекулярная масса или рI) сильнее сказывается на связывании белков исследуемыми поверхностями. С этой целью

на предварительно смоченные картриджи с сорбентами наносили аликвоты растворов белков, различающихся указанными характеристиками.

Из диаграммы на Рис. 6 и данных Табл. 1 следует, что все исследованные сорбенты удерживают белки (65% - 85% от нанесенного количества). Сорбционная емкость РА1-, РА8- и РА11-материалов мало зависит как от молекулярной массы, так и от рI белка, и составляет 6.8 – 8.2 мг белка/г сорбента. И только в случае РА7- материала обнаруживается зависимость сорбционной емкости от значения рI белка, но не от молекулярной массы (6.4 - 8.7 мг/г). В еще большей степени эта зависимость проявляется у ПАНИ-содержащих сорбентов (5.9 – 9.2 мг/г).

Таким образом, при использовании как РА7-, так и ПАНИ-содержащих материалов сорбционная емкость растет с увеличением основности (рI) белка. Как будет показано ниже, выявленное свойство ПАНИ-содержащих сорбентов можно использовать для разделения компонентов белковой фракции.

Различия в средстве исследуемых полимерных покрытий к НК и белкам подтверждаются результатами очистки ДНК от БСА при пропускании смеси этих биополимеров через картриджи с сорбентами. Сравнение величин отношений поглощения при 260 и 280 нм (A_{260}/A_{280}) для растворов ДНК и белка, для их смеси и для полученных элюатов показало, что материалы РА1 и РА7 (содержащие трифторметильные группы) по способности очищать препараты ДНК от белков сравнимы с перфторполимер- и ПАНИ-сорбентами. Образцам ДНК, очищенным от белка, соответствуют отношения оптического поглощения A_{260}/A_{280} , равные 1.5 (РА1- и ПТФЭ-сорбенты), 1.7 (РА7-сорбент) и 1.9 (ФП-ПАНИ-сорбент). Близкие результаты получены для

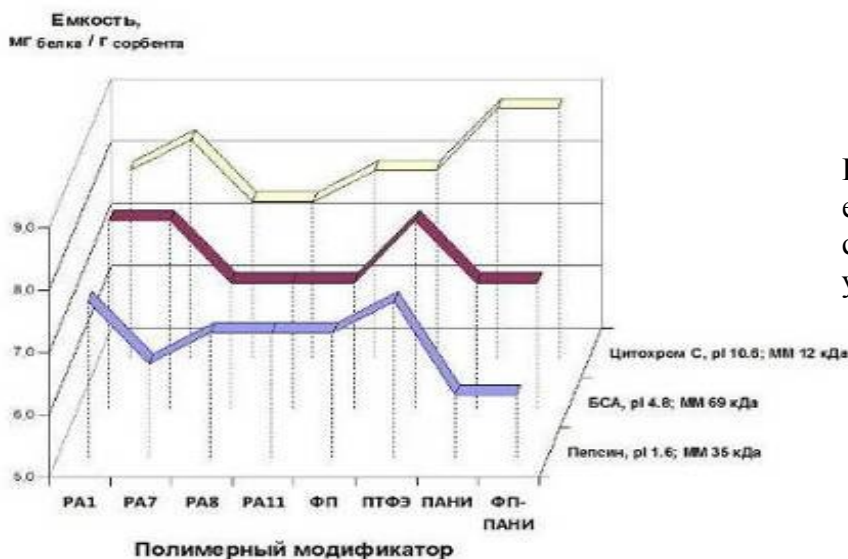


Рисунок 6 - Сорбционная емкость исследованных сорбентов на примере удерживания трех белков.

элюатов, выделенных из лизатов *E. coli* (1.5, 1.6 и 1.8, соответственно). Таким образом, наиболее близкие сорбционные свойства по отношению к биополимерам проявляют полиарамиды с электроноакцепторными группами и ПАНИ-содержащие материалы. Это означает, что введение в структуру полимерного модификатора фторсодержащих функциональных групп, незначительно, на первый взгляд, изменяющих суммарный химический состав,

оказывает заметное влияние на сорбционные свойства получаемых полимерных покрытий.

Степень очистки ДНК, выделенной из бактериальных лизатов с помощью ПАНИ-, РА1- и РА7-сорбентов, обеспечивает возможность их непосредственного использования в ПЦР (см. пример на Рис. 7).

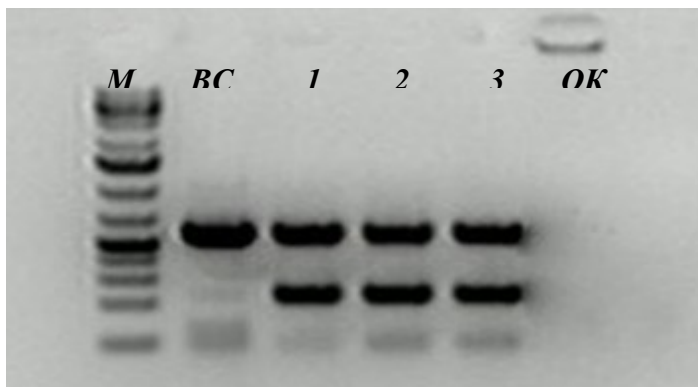


Рисунок 7 - Электрофореграмма ПЦР-фрагментов, полученных в результате ПЦР с элюатами, содержащими ДНК, выделенную из *Agrobacterium tumefaciens* C58 при использовании сорбента РА7 (1 - 3). М - ДНК-маркер (GeneRuler™ 20000—75 п.о., Fermentas, США); ВС - внутренний стандарт; ОК - отрицательный контроль (вода).

Таким образом, одновременное проявление эффектов «*негативной селекции*» в отношении НК и «*позитивной селекции*» в отношении белков свойственно широкому кругу полимеров, имеющих в своей структуре атомы фтора и/или азота. Полиарамиды оказались удачной моделью для изучения сорбционных свойств фторсодержащих полимеров и ПАНИ, но их применение в качестве эффективных сорбентов для выделения НК не целесообразно. По сравнению с ними ФП- и ПАНИ-сорбенты обеспечивают максимальный выход *днДНК* за счет «*негативной селекции*», эффективнее связывают РНК и белки, что делает такие композиты перспективными материалами для одностадийного выделения очищенных препаратов НК из биологических смесей (Глава 5).

3.3.2. Удерживание биополимеров полученными сорбентами в режиме динамической сорбции. Информацию о механизме взаимодействия исследуемых полимеров с НК и белками получали, исследуя сорбцию биополимеров в динамическом режиме в реальном времени методом спектрально-корреляционной интерферометрии (СКИ) с использованием биосенсора (включающего проточную микроячейку и детектор), в котором интерферометром служит тонкая стеклянная пластина с нанесенным покрытием исследуемого полимера. Над поверхностью покрытия пропускали раствор биополимера и измеряли интерференцию между опорным лучом, отраженным от нижней поверхности пластины, и лучом, отраженным от поверхности раздела «адсорбционный слой – вода», фиксируя изменение толщины адсорбированного слоя в пикометровом диапазоне. Покрытия полиарамидов РА1, РА7, РА8 и РА11 получали нанесением растворов указанных полимеров в ТГФ методом *spin-coating*. ПАНИ-покрытие получали в результате осадительной окислительной полимеризации анилина.

Исследовали сорбцию *днДНК* из *E. coli* и белков (БСА, лизоцима и пепсина) в натрий-фосфатном буфере, рН 7.2. Растворы (или смеси) пропускали до «насыщения» сигнала, т. е. до момента, когда скорость изменения сигнала не

превышала 30 пм/мин. За продолжительность формирования насыщенного адсорбционного слоя принимали период между началом заметного роста сигнала (≥ 50 пм/мин) до его насыщения. Затем систему промывали чистым буферным раствором.

Фосфатные группы в молекуле ДНК полностью ионизированы при $\text{pH} = 4.0$. Таким образом, молекула ДНК заряжена отрицательно при $\text{pH} \geq 4.0$. В условиях проведения эксперимента ($\text{pH} 7.2$) заряд молекулы БСА наиболее близок к нейтральному по сравнению с другими исследованными белками, суммарный заряд лизоцима положительный, пепсина - отрицательный. Из Рис. 8 видно, что при пропускании раствора ДНК над поверхностью ПАНИ-модифицированной пластины адсорбционный слой не образуется (желтая линия), что коррелирует с результатами исследований удерживания ДНК в режиме статической сорбции. Поскольку сорбционная емкость ПАНИ-покрытия зависит от pH среды, можно ожидать, что в нейтральных средах белки с более высокими значениями pI будут сильнее удерживаться на ПАНИ-поверхности, что и подтвердилось экспериментально. Макромолекулы пепсина ($\text{pI} 2.2$) в среде с $\text{pH} 7.2$ не образовывали адсорбционного слоя. В случае БСА и лизоцима на ПАНИ-поверхности формировался устойчивый адсорбционный слой, сохранявшийся после прекращения подачи раствора белка и разрушавшийся только в результате заметного понижения pH среды (до 3.0).

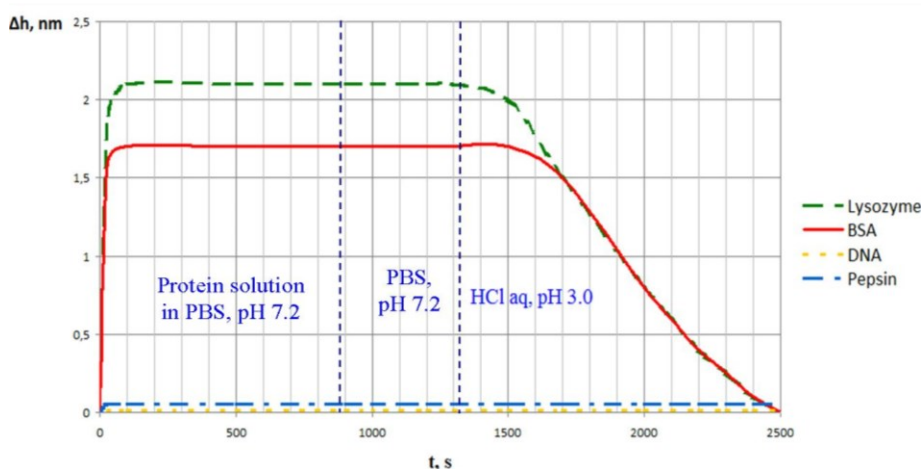


Рисунок 8 - Динамика сорбции биополимеров на поверхности стеклянных пластин, модифицированных ПАНИ (скорость потока 15 мкл/мин).

При пропускании раствора БСА над поверхностями полиарамидных покрытий количество адсорбированного белка было максимально в случае РА11-покрытия и минимально в случае РА1-покрытия. При подаче в растворов белков с $\text{pI} > 4$ обратимо формировался адсорбционный слой толщиной 0.2 - 2.5 нм, который разрушался при подаче подвижной фазы, не содержащей белки. Время насыщения адсорбционного слоя (т. е. время с момента подачи раствора биополимера до выхода сенсограммы на плато) на полиарамидных покрытиях превышало в 2.5 – 8.75 раз этот показатель по сравнению с ПАНИ-покрытием. Таким образом, *динамическая сорбционная активность* ПАНИ-покрытия проявляется сильнее по сравнению с покрытиями из полиарамидов. Толщина формируемого слоя молекул белка на поверхности ПАНИ-покрытия в

большинстве случаев также превышала рассматриваемую величину, незначительно уступая только покрытию на основе РА11.

БСА является наиболее гидрофобным из использованных белков (молярная гидрофобность БСА составляет 1130 кДж/моль, пепсина - 865 кДж/моль, лизоцима – 306 кДж/моль [Демин А.А. и др. Ионнообменная сорбция биологически-активных веществ. С.-Петербург: Издательство СПбГУ. 2008. 154 с. С. 69]). Наиболее гидрофобные покрытия (содержащие трифторметильную группу) эффективно удерживают только БСА (толщина адсорбционного слоя 1.0 - 1.5 нм) и слабо удерживают менее гидрофобный положительно заряженный лизоцим (~ 0.2 нм). Пепсин в данных условиях вообще не удерживается ни одной поверхностью. Таким образом, полиарамида с электрондонорными группами (РА1 и РА7) нецелесообразно использовать для сорбции основных белков. В данных условиях РА8-покрытие удерживает как отрицательно заряженный БСА, так и положительно заряженный лизоцим (толщина слоя ~ 1.3 нм), в то время как на ПАНИ-покрытии адсорбционный слой насыщается в 2.5 раза быстрее при сорбции БСА и в 5 раз быстрее при сорбции лизоцима.

Метод СКИ дает усредненные значения толщины адсорбированного слоя. Поэтому, если поверхность не полностью покрыта молекулами сорбата, то регистрируемая толщина слоя будет меньше эффективного размера белковой глобулы. Во всех рассмотренных случаях, по-видимому, формируется мономолекулярный белковый слой, что следует из сравнения эффективных гидродинамических радиусов исследованных белков с учетом их молекулярных масс, числа аминокислотных остатков в составе полипептидной цепи и наличия четвертичной структуры у БСА.

В результате промывки поверхности модифицированных пластин чистой подвижной фазой и повторной подачи растворов белков снова наблюдается формирование адсорбционного слоя. Однако только на ПАНИ-покрытии формируется устойчивый слой молекул белка, который удерживается на поверхности полимера при промывке буферным раствором с нейтральным рН. Таким образом, в нейтральной водной среде (оптимальной для выделения биополимеров) поверхности исследованных полиарамидов обладают более слабым сродством к белкам по сравнению с ПАНИ-поверхностью.

Из сравнения данных по статической и динамической сорбции белков следует, что кислый белок пепсин удерживается объемно-пористыми сорбентами, в то время как при исследовании методом СКИ адсорбционный слой пепсина на всех исследованных поверхностях не образуется. Наиболее вероятно, что это различие обусловлено проявлением ситового (эксклюзионного) эффекта при контакте раствора белка с пористыми сорбентами, подобно тому, как это проявляется при проведении гель-проникающей хроматографии. По-видимому, пепсин удерживается в порах, наличие которых подтверждено для всех исследованных образцов, что в целом усиливает способность разработанных композитов удерживать суммарную белковую фракцию при очистке ДНК от белков.

3.4. Вероятные механизмы сорбции НК и белков на исследованных сорбентах. Поскольку степень очистки ДНК как от белка, так и от РНК изменяется в зависимости от структуры использованного полимерного модификатора, можно предположить, что сорбционные свойства исследованных сорбентов определяются суммарным вкладом различных механизмов сорбции, происходящей в результате нековалентных взаимодействий (образования гидрофобных, ионных и водородных связей). Тот факт, что все материалы практически не удерживают отрицательно заряженную гидрофильную *днДНК* и одновременно более эффективно сорбируют РНК, содержащую гидрофобные участки, указывает на роль гидрофобных взаимодействий между поверхностью сорбента и молекулами сорбата. Присутствие в структуре полиарамидов и ПАНИ полярных групп и слабый положительный заряд поверхности соответствующих полимерных покрытий указывают на то, что соответствующие материалы должны обладать анионообменными свойствами. Вместе с тем, эти сорбенты (как и фторполимерсодержащие материалы) крайне слабо удерживают молекулы *днДНК*. По-видимому, ионообменные свойства этих сорбентов выражены слабо не только за счет стерических затруднений, но также за счет делокализации положительных зарядов по макромолекуле или даже между несколькими макромолекулами в составе покрытия. Как известно, это справедливо для ПАНИ-содержащих материалов [Walter W., et al. *J. Phys. Chem.*, 1987, V. 91. N 22. P. 5813–5818] и препятствует образованию устойчивой ионной связи, требующей локализации и достаточного сближения противоположных зарядов на соответствующих атомах сорбента и сорбата. Поэтому молекулы *днДНК*, дополнительно стабилизированные многочисленными водородными связями внутри двунитевой структуры, на таких поверхностях не удерживаются, а макромолекулы белков, имеющие локализованные заряды на экспонированных в водной среде боковых группах, удерживаются в различной степени в зависимости от значения их pI .

Наиболее вероятный вклад в сорбционные свойства фторполимерсодержащих сорбентов обусловлен преимущественно гидрофобными взаимодействиями. Белковая фракция сорбируется из водной среды на неполярной поверхности фторполимера, характеризующейся низкой поверхностной энергией, в то время как отрицательно заряженные в широком диапазоне pH молекулы *днДНК* не удерживаются. РНК слабо удерживается и затем может быть элюирована в изократическом режиме. Полиарамидные материалы, содержащие наряду с гидрофобными участками электроноакцепторные группы (РА1 и особенно РА7) по выходу ДНК и по удерживанию белков оказались ближе всего к материалу ФП-ПАНИ.

Существенный вклад в механизм обратимой сорбции белков на ПАНИ-поверхности, по-видимому, вносит способность молекулы ПАНИ к образованию водородных связей между атомом водорода вторичной аминогруппы и акцепторами водородной связи в молекуле белка (пептидная связь и стерически доступные боковые группы, например, Glu, Gln и др.). При

понижении pH подвижной фазы изменяется заряд белковой молекулы. В результате протонирования атомов азота в макромолекуле ПАНИ белок десорбируется за счет разрушения водородных связей. Большая толщина слоя молекул БСА на PA11-покрытии по сравнению с PA8-покрытием, вероятно, является следствием наличия в структуре PA11 электроноакцепторной сульфонильной группы, которая, оттягивая на себя электронную плотность ароматического кольца, придает поверхности псевдо-ионообменные свойства (относительный отрицательный заряд в этой группе сосредоточен на атомах кислорода, относительный положительный – на атоме серы), что подтверждается удерживанием положительно заряженного лизоцима (толщина слоя ~ 2.5 нм).

Поэтому с большой вероятностью можно утверждать, что вклад в сорбцию белков на ПАНИ-модифицированной поверхности и на полиарамидных покрытиях вносят как полярные, так и гидрофобные участки в составе макромолекул полимерных модификаторов.

3.5. Выводы из результатов исследования сорбционных свойств полимерных сорбентов. В отличие от сорбционных материалов, в определенных условиях удерживающих НК (таких как, например, полиэтиленмин или кремнеземы) и не связывающих белки (например, кремнеземы, полипропилен или полиакриламид), композиты, модифицированные ФП, ПАНИ и некоторыми полиарамидами, ведут себя противоположным образом (Рис. 9). Подбирая соответствующий полимерный модификатор, можно решать конкретные задачи по селективному выделению биополимеров из сложных смесей, используя «нулевую» сорбционную способность к удерживанию ДНК и способность к обратимой сорбции белков в зависимости от значения их pI. Количественные параметры сорбции при этом зависят как от химической структуры полимерного покрытия в составе сорбента, так и от природы молекул сорбата, и в значительно меньшей степени – от морфологии поверхности сорбента.

Из всех исследованных полимермодифицированных материалов ПАНИ-сорбенты наряду с фторполимерсодержащими сорбентами следует рассматривать в качестве наиболее перспективных материалов для использования в пробоподготовке в молекулярной диагностике.

Сорбционные свойства исследованных материалов определяются суммарным вкладом различных механизмов сорбции, происходящей в результате гидрофобных, диполь-дипольных взаимодействий и образования водородных связей. Зная химическую структуру полимерного покрытия композита, можно уверенно предсказывать его сорбционные свойства в условиях разделения смесей НК и белков. Это также означает, что для получения одинакового хроматографического эффекта при разделении смесей биополимеров можно использовать сорбенты, обработанные различными по химической структуре полимерными модификаторами (фторполимеры, полиарамиды и/или ПАНИ), демонстрирующими эффект «*негативной селекции*» в отношении НК.

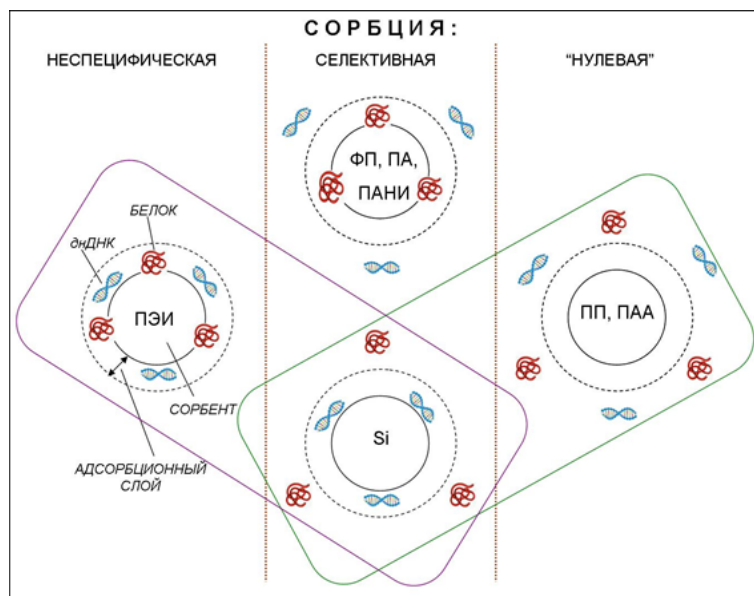


Рисунок 9 - Возможные типы сорбции НК и белков на различных материалах:

ПЭИ – полиэтиленимины,
 ФП - фторполимеры,
 ПА – полиарамиды,
 ПАНИ – полианилины,
 ПП – полипропилен,
 ПАА – полиакриламид,
 Si – кремнезем.

Глава 4. Разработка технологичных способов синтеза полимерсодержащих композитов для выделения биополимеров и характеристика полученных полимерных покрытий.

Ни ПТФЭ, ни ПАНИ не обладают удовлетворительными механическими и технологическими свойствами, позволяющими изготовить из них качественные пористые сорбенты. Очевидным путем решения этой проблемы является создание композиционных сорбентов - материалов на основе твердых носителей, модифицированных нанослоями соответствующих полимеров.

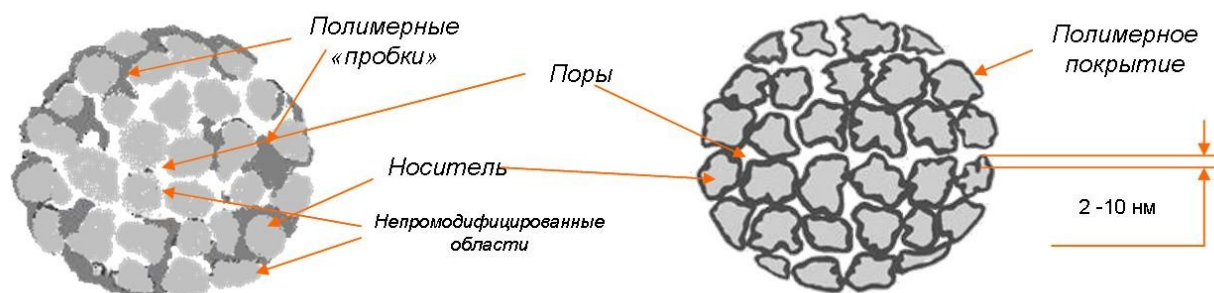


Рисунок 10 – Морфология композиционных полимерсодержащих сорбентов. Полимерное покрытие должно быть тонким и равномерно распределенным по поверхности носителя, обеспечивая снижение неспецифической сорбции и повышение химической стабильности композиционного сорбента. При этом значения внутреннего диаметра и объема пор носителя не должны значительно уменьшаться.

Суть предложенного подхода состоит в нанесении сплошных равномерно распределенных полимерных нанослоев (толщиной 2 – 10 нм) требуемой химической структуры на поверхность твердых матриц с получением нанокompозитного материала, поверхность которого, контактирующая с биологическими молекулами или частицами, будет вести себя как

соответствующий полимер, а жесткость и морфология (пористость и удельный объем носителя) определяются свойствами исходной матрицы. В качестве носителей могут использоваться объемно-пористые частицы, синтетические мембраны, капилляры и др. (в зависимости от назначения получаемого композита). Прямой синтез таких нанокompозитов предполагает, что реакции синтеза макромолекул будут сопровождаться образованием однородных полимерных нанопокpытий, прочно связанных с поверхностью носителя, в том числе с внутренней поверхностью пор.

Чтобы синтезировать такой композит, желательно предварительно тем или иным способом активировать поверхность носителя. Структура получаемого материала по сравнению с морфологически менее совершенным композитом того же брутто-состава схематически представлена на Рис. 10 (на примере объемно-пористой дисперсной частицы). В результате использования неактивированного носителя (структура слева) нередко получают неоднородное и неравномерно распределенное по поверхности носителя покрытие (с полимерными «пробками» в просветах пор и с непокрытыми участками), что снижает селективность сорбции, химическую стойкость материала подложки и усиливает нежелательную неспецифическую сорбцию. Напротив, можно ожидать, что использование носителя с активированной поверхностью (структура справа), позволит получать химически стойкие высокоселективные композиты с низким уровнем неспецифической сорбции, высокой удельной площадью поверхности и однородным распределением поверхностных функциональных групп, что обеспечит интенсификацию поверхностных сорбционных и/или химических процессов.

Таким образом, наряду с решением «обычных» химических задач, сопровождающих синтез макромолекул, при получении композитов следует обеспечить выполнение дополнительных условий: (1) локализовать реакцию на поверхности носителя (по возможности избегая протекания реакции в объеме реакционной смеси); (2) контролировать толщину (на нанометровом уровне) и морфологию (обеспечивая получение бездефектного слоя) полимерного покрытия; (3) стремиться к разработке «универсального» воспроизводимого метода синтеза, пригодного для химически различных систем. В рамках исследования также предполагалось показать, что из одной «базовой» матрицы возможно получать широкий набор композитов с различным гидрофильно-липофильным балансом, с различными ионогенными группами, а также материалов, содержащих иммобилизованные биомолекулы.

4.1. Разработка технологических способов получения ПФБД-, ФП-, полиарамид- и ПАНИ-содержащих композиционных сорбентов. Разработанные подходы к получению композитов со стойкими нанотолщинными полимерными покрытиями удобно формально подразделить на две группы.

4.1.1. Получение композиционных сорбентов в присутствии неактивированного носителя или с получением прекурсора. К первой

группе относятся способы, в которых композит с полимерным нанопокрытием получали в результате полимеризации мономера *в присутствии неактивированного носителя*. К этой группе также следует отнести способы, в которых слой готового *прекурсора* (олигомера или полимера) предварительно наносили на поверхность носителя методом «кастинга», а затем иммобилизовали на поверхности носителя за счет химического отверждения (в том числе, в результате полимераналогичных превращений).

4.1.1.1. Получение ПАНИ-содержащих композитов путем химического осаждения полимерного нанопокрытия. ПАНИ-покрытия могут быть получены на поверхности твердых носителей различной природы методом окислительной осадительной полимеризации анилина. Процесс отличается наличием индукционного периода, автокаталитическим характером и нередко сопровождается завершением реакции до полного исчерпания мономера. При этом важно получить первый слой ПАНИ, а образование последующих слоев будет катализироваться предыдущими слоями. Очевидно, что природа поверхности носителя может влиять на характер полимеризации анилина.

Для сравнительной оценки этого влияния исследовали кинетику полимеризации анилина в присутствии носителей, различающихся кислотностью поверхности. В качестве носителей использовали частицы оксида алюминия (содержащие льюисовские кислотные центры), шитые полистирольные сульфированные катионообменные смолы (КУ-2 и Dowex – т. е. кислоты Брэнстеда), а также нейтральные в условиях проведения эксперимента частицы кремнезема марки МПС-1150.

Кинетическая кривая полимеризации анилина в кислых условиях в отсутствие носителя имеет S-образную форму, что легко подтверждается экспериментально в результате регистрации убыли мономера в реакционной смеси или прироста массы образующегося полимера. Внесение в реакционную смесь частиц катионообменных смол приводило к сокращению индукционного периода на порядок (до 1 мин) по сравнению с индукционным периодом при полимеризации в отсутствие носителя или в присутствии кремнезема. ПАНИ-покрытия на поверхности частиц катионообменной смолы формировались без добавления допанта (кислоты), а S-образная форма кинетической кривой в целом сохранялась. Установлено, что при полимеризации анилина как в присутствии частиц оксида алюминия (при добавлении кислоты-допанта), так и на поверхности катионитов (без добавления низкомолекулярной кислоты) реакционная смесь со временем подкисляется (в первом случае - более чем на единицу, а во втором случае - на 3 единицы). Т. е., в последнем случае полимеризация в основном протекает при $pH = 2$, как и при полимеризации в присутствии соляной кислоты.

Присутствие частиц кремнезема, не оказывающего каталитического воздействия на полимеризацию анилина в кислой среде, практически не изменяет вид кинетической кривой, получаемой в отсутствие носителя, что дает возможность получать ПАНИ-содержащие композиты с заданной морфологией покрытия, которая определяется условиями проведения процесса,

а не свойствами носителя. Однако при этом полимеризация параллельно протекает на поверхности и в объеме реакционной смеси, и до 60% мономера расходуется на образование взвеси полимерных частиц в объеме реакционной смеси. Эти частицы оседают на поверхность ПАНИ-модифицированного носителя, слабо удерживаясь на ней и загрязняя сорбент (особенно поверхность пор), что весьма существенно усложняет процедуру отмывки материала.

Установлено, что, во-первых, при использовании поверхностей, представляющих собой поликислоты, мономер расходуется преимущественно на образование ПАНИ-покрытия, а не на образование взвеси полимерных частиц в объеме реакционной среды. Во-вторых, при полимеризации анилина в присутствии твердого носителя важно вначале обеспечить условия для получения первого слоя ПАНИ, а образование последующих слоев будет катализироваться предыдущими слоями. Таким образом, существует, по крайней мере, один путь для локализации процесса формирования ПАНИ-покрытия на поверхности носителя - использование носителей с кислотными поверхностными группами.

4.1.1.2. Получение композиционных полимерсодержащих сорбентов методом кастинга. Для нанесения на поверхность носителей сплошных нанотолщинных слоев полимеров, растворимых в подходящих растворителях, использовали метод «кастинга», предварительно модифицированный (с использованием ультразвуковой обработки) для повышения эффективности получения покрытий на объемно-пористых носителях.

4.1.1.2.1. Получение ПФБД-содержащего сорбента методом кастинга с последующим фторированием. Разработан способ получения полифторбутадиенсодержащих сорбентов. После смачивания кремнезема раствором олигобутадиена в летучем растворителе систему обрабатывали ультразвуком для равномерного распределения модификатора по объему пор. Удалив растворитель, получали прекурсор – кремнеземный материал с олигобутадиеновым покрытием, который затем обрабатывали *in situ* парами XeF_2 в атмосфере аргона (в «режиме псевдооживления»). Фторирование сопровождалось химическим структурированием полимера за счет рекомбинации макрорадикалов и взаимодействия радикалов с кратными связями с образованием поперечно-сшитого фторированного полимерного покрытия. Благодаря замещению атомов водорода атомами фтора модифицируются поверхностные свойства полимерного покрытия (без изменения его объемных свойств). Использование XeF_2 в качестве фторирующего агента значительно упростило технологию фторирования по сравнению с обработкой смесью фтора с азотом.

4.1.2. Получение полимерсодержащих сорбентов с использованием активированных носителей. *Вторая группа* разработанных методов включает способы синтеза композитов, основанные на *локализации процесса полимеризации на активированной поверхности носителя*, т. е. когда полимеризация инициируется определенными функциональными группами на поверхности носителя и протекает на его поверхности. С целью локализации

процесса полимеризации анилина на поверхности носителя разработан ряд способов, основанных на предварительной иммобилизации на поверхности носителя полимерных нанослоев, содержащих функциональные группы – источники протонов. Для локализации полимеризации мономеров, полимеризующихся по различным механизмам (фтормономеры, анилин и др.) разработан способ активации кремнеземной матрицы озоном, позволивший получить гетерофазный инициатор полимеризации, поверхность которого одновременно служит подложкой при синтезе сорбента.

4.1.2.1. Получение ПАНИ-сорбентов на основе кремнезёмов, модифицированных сульфированным сополимером стирола с дивинилбензолом (ПС-ДВБ-SO₃). При окислительной полимеризации анилина на первой стадии образуется катион-радикал анилина. Предполагали, что эффективными матрицами, одновременно обеспечивающими протонирование анилина и локализацию процесса полимеризации на поверхности носителя, могут служить твердые нерастворимые поликислоты (кислые катионообменники). Для получения такой матрицы поверхность кремнезёма сначала модифицировали политетрафторэтиленом методом пост-радиационной

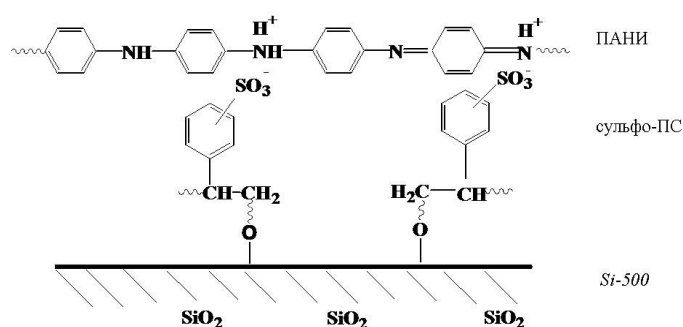


Рисунок 11 –
Схематическое представление структуры полимерного нанослоя в образцах ПС-ДВБ-ПАНИ-содержащих сорбентов.

прививочной полимеризации. На полученное покрытие методом пост-радиационной блоксополимеризации прививали сополимер стирола с дивинилбензолом (ПС-ДВБ). Затем полученный ПС-ДВБ-кремнезём сульфировали разбавленной серной кислотой, варьируя продолжительность обработки. В результате получали материалы с различным содержанием поверхностных сульфогрупп. При полимеризации анилина на поверхности таких носителей практически отсутствовал индукционный период полимеризации. Образование частиц ПАНИ в объеме реакционной системы не наблюдали, конверсия мономера повышалась пропорционально увеличению содержания поверхностных сульфогрупп. Структура поверхностного слоя полученного материала схематически представлена на Рис. 11.

4.1.2.2. Получение ПАНИ-содержащих кремнеземных сорбентов в результате матричной полимеризации анилина в присутствии иммобилизованных полисульфокислот (ПСК). Локализовать процесс формирования ПАНИ-покрытия на поверхности носителя также удалось в результате проведения *матричной полимеризации*, протекающей с образованием полимерных комплексов, состоящих из растворенных макромолекул «матрицы» и синтезируемого на них ПАНИ. В отличие от осадительной полимеризации анилина в присутствии низкомолекулярной

модификатора при хранении (в виде раствора или порошка). Полученные в форме порошка комплексы не растворяются в органических растворителях (кроме ТГФ и ДМФА), однако хорошо растворимы в воде. Такие комплексы можно использовать по мере необходимости для приготовления водных растворов требуемой концентрации (в зависимости от пористости используемого носителя и от желаемой толщины полимерного покрытия), применяемых в качестве полимерного реагента для модифицирования поверхности силанированных кремнеземов.

4.1.2.3. Синтез кремнеземных сорбентов, модифицированных сополимерами анилина с замещенными анилинами. Следует ожидать, что придание поверхности сорбента дополнительной функциональности за счет введения в состав полимерного модификатора определенных функциональных групп позволит расширить область применения получаемых сорбентов. Так, введение известного количества замещенных анилиновых звеньев в структуру ПАНИ должно приводить к контролируемым изменениям растворимости полимерного модификатора, гидрофильно-липофильных свойств поверхности получаемого сорбента и повышать эффективность иммобилизации полимерного нанопокрывтия на активированной поверхности носителя. Поскольку химическая модификация готового ПАНИ в силу его химической стойкости неэффективна, поверхность кремнезема модифицировали предварительно синтезированными сополимерами анилина с 3-аминобензойной кислотой (3-АБК), *n*-нитроанилином или *o*-толуидином.

Например, устойчивое покрытие на основе сополимеров анилина с 3-АБК было получено в случае преобладания в сополимере анилиновых звеньев (при содержании остатков 3-АБК свыше 50% сополимеры становятся растворимыми в воде при щелочных рН). Для получения устойчивого в водных средах сорбента, содержащего карбоксильные группы, проводили хемосорбцию активированного карбодиимидом сополимера анилина с 3-АБК на поверхности силанированного кремнезема.

Возможность направленного изменения свойств ПАНИ-поверхности за счет введения различных функциональных групп в состав анилинсодержащих сополимеров в дальнейшем позволила расширить область применения ПАНИ-содержащих материалов. В частности, разработаны покрытия с уникальными свойствами для масс-спектрометрического анализа пептидов (Глава 5).

4.1.2.4. Озон-индуцированная полимеризация на поверхности твердых носителей. Показано, что поверхность кремнеземного носителя может быть активирована в результате обработки озоном с образованием активных центров различной природы. Кремнезем (диоксид кремния) не реагирует с озоном, однако кремнеземы, как правило, содержат примеси оксидов железа или алюминия (0.5 - 3.5% мас.), которые под действием озона образуют ион-радикальные и/или пероксидные группы, способные инициировать полимеризацию различных мономеров. Установлено, что активированный озоном кремнезем можно использовать в качестве гетерогенного инициатора полимеризации мономеров, полимеризующихся по различным механизмам

(фтормономеры, анилин, стирол и др.). Обработку носителя озонново-воздушной смесью (вместо чистого кислорода) в течение 1 - 4 ч и последующую (со)полимеризацию мономеров на активированной поверхности носителя проводили на специально сконструированной установке с озонатором. Получены сорбенты, модифицированные ПТФЭ (с использованием образующихся поверхностных радикалов без добавления инициатора) и ПАНИ (с использованием поверхностных пероксидов без добавления окислителя). Выход ПТФЭ зависел от содержания радикалов на поверхности кремнезема: материал на основе кремнезема Proligo-500 содержал 8 – 11.5 мас. % полимерной фазы (от общей массы композита); материал на основе кремнезема Si-500 - от 21.0 до 25.5 мас. %. В систему дополнительно вводили гексафторпропилен (ГФП) во избежание образования концевых заряженных кислородсодержащих групп с целью уменьшения неспецифической сорбции биополимеров, либо аллиламин (АА) или аллиловый спирт (АС) с целью введения дополнительных функциональных групп для повышения гидрофильности поверхности и селективности получаемых материалов в процессах разделения смесей одно- и двунитевых НК (Глава 5). Сомономеры вводили одновременно с ТФЭ в режиме пост-полимеризации, либо после исчерпания ТФЭ на первом этапе, обеспечивая повышенное содержание поверхностных amino- или гидроксигрупп, соответственно.

Установлено, что озонированный кремнезем эффективен в качестве гетерогенного инициатора окислительной полимеризации анилина в отсутствие низкомолекулярного окислителя. В этом случае ПАНИ-покрытие образуется на поверхности частиц носителя, а взвесь полимерных частиц в реакционном объеме отсутствует (Рис. 13). По-видимому, поверхностные пероксидные группы участвуют в образовании катион-радикала анилина, а получаемые на первой стадии полимеризации продукты удерживаются на поверхности носителя, и последующий рост макромолекул ПАНИ происходит в приповерхностном слое носителя.

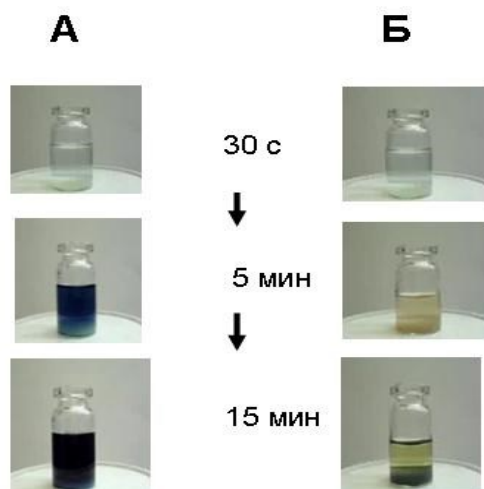


Рисунок 13 - Результаты полимеризации анилина в различных условиях: А – окислительная полимеризация в присутствии немодифицированного кремнезема; Б – полимеризация на поверхности кремнезема, предварительно обработанного озоном.

ТФЭ, АА и АС полимеризуются по радикальному механизму, анилин - по окислительному механизму. Таким образом, обработанный озоном кремнезем можно рассматривать в качестве универсального гетерогенного инициатора.

Разработанный подход обеспечивает относительно безопасный и воспроизводимый способ получения ПАНИ- и ФП-содержащих композитов, содержащих дополнительные функциональные группы на поверхности.

4.1.2.5. ПАНИ-содержащие сорбенты на основе гидрофобизованного носителя. На стадии индукционного периода при полимеризации анилина образуются гидрофобные феназинсодержащие олигомерные продукты. Разумно

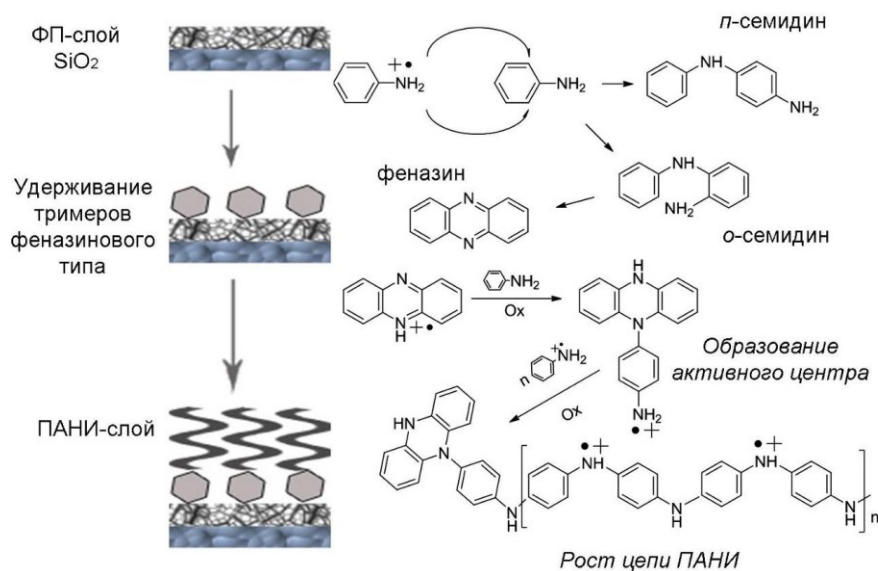


Рисунок 14 - Принцип получения ФП-ПАНИ-сорбента.

предположить, что синтез ПАНИ можно локализовать на поверхности гидрофобизованной матрицы, например, покрытого фторполимером кремнезема. Кремнезем обрабатывали раствором фторопласта-42Л (ФП), после удаления растворителя на поверхности носителя получали нанотолщинное гидрофобное ФП-покрытие (Рис. 14). При полимеризации анилина в присутствии полученного носителя, низкомолекулярной кислоты и окислителя образующиеся гидрофобные олигомеры прочно сорбировались на гидрофобизованной поверхности, служащей в данном случае «матрицей», удерживающей растущие макромолекулы ПАНИ. Расход мономера на образование полимерных частиц в объеме смеси понижался по сравнению с синтезом ПАНИ в присутствии необработанного кремнезема в 6 – 8 раз. Полученный технологический эффект определяется тем, что локализация полимеризации анилина на поверхности носителя достигается в отсутствие сомодификаторов ПАНИ и без предварительной химической активации поверхности носителя. Кроме того, отпала необходимость в обработке полученного материала водным аммиаком для предотвращения образования взвеси полимерных частиц в реакционном объеме, что необходимо при синтезе ПАНИ-содержащих композитов в присутствии неактивированных носителей. Разработан регламент на опытно-лабораторное производство композиционного сорбента Si-500-ФП-ПАНИ.

4.2. Способы получения ПАНИ-содержащих композитов на основе не кремнеземных носителей. При формировании ПАНИ-покрытий на неорганических или органических носителях (свойствами которых

определяются механические и морфологические характеристики получаемых материалов) важно учитывать особенности конструкции биосепарирующего элемента, в состав которого будет включен получаемый композит.

4.2.1. Получение ПАНИ-содержащих сорбционных материалов на основе стеклянных мультикапилляров. Использование мультикапиллярных (МК) систем в качестве носителей при получении ПАНИ-модифицированных сорбентов обеспечивает возможность контролировать точный объем анализируемой пробы (что особенно важно при количественном выделении).

Промодифицировать поверхность МК анилинсодержащими покрытиями можно двумя путями. Во-первых, заполняя объем МК реакционной смесью и проводя полимеризацию анилина, протекающую как на внутренней поверхности стенок капилляров, так и в их объеме. Частицы полимера, слабо связанные с покрытием, легко удаляются промывкой. Во-вторых, в качестве полимерного модификатора можно использовать растворы сополимеров анилина с замещенными анилинами подходящего состава.

Для выделения биополимеров из биологических образцов оптимальны МК-структуры шириной 4 мм и длиной 60 мм, с капиллярами диаметром 40 мкм, которые могут быть впаяны в стандартные пластиковые наконечники для ручных или автоматических дозаторов. Для работы с наконечниками не требуется дополнительное оборудование (центрифуги, насосы и пр.). Эти наконечники также можно присоединять к шприцам, обеспечивая работу с большими объемами образца. Разработанная технология запатентована.

4.2.2. Синтетические мембраны в качестве носителей при получении ПАНИ-содержащих сорбционных материалов. Полимерные мембраны отличаются жесткостью каркаса, развитой поверхностью, стойкостью к воздействию агрессивных сред, ненабухаемостью, возможностью в широких пределах изменять структурные характеристики (удельную поверхность, структуру и размер пор). В ряде случаев использование мембранного носителя позволяет упростить и ускорить процесс получения сорбционного материала и изготовление биосепарирующего элемента (микроколонки или картриджа).

В качестве подложек при получении ПАНИ-модифицированных сорбентов использовали синтетические мембраны МФФК (фторопластовая гидрофобная), МФФК-Г (фторопластовая гидрофилизованная), ММК (микрофльтрационная полиамидная), МКМ (капроновая), ММПА+ (нейлоновая с положительным поверхностным зарядом), ПА-66 (полигексаметиленадипинамидная) и МПС (полиэфирсульфоновая) – любезно предоставленные ООО НПП «Технофильтр» (Россия). Разработаны технологичные способы получения мембранных ПАНИ-сорбентов. Важно подчеркнуть, что модифицированную ПАНИ-покрытием мембрану в составе БЭ предполагалось использовать не в качестве фильтра, а в качестве селективного сорбента (в скрученном особом образе виде), благодаря чему не происходила фильтрация образца через мембрану, но обеспечивался максимальный контакт образца с поверхностью мембраны. Способ получения

мембранного сорбента запатентован. Разработан регламент на опытно-лабораторное производство мембранного сорбента ММК-2-ПАНИ.

4.3. Морфология, химический состав и гидролитическая стабильность полученных сорбентов. Морфологию поверхности всех полученных

Таблица 3 - Характеристики полимерных покрытий в полученных композитах.

Носитель- полимерный модификатор	Средние эффективные диаметры пор носителя/ сорбента, нм	Средняя эффектив- ная толщина покрытия, нм	Доля полимерного покрытия в составе композита, % мас.	Отношение скоростей растворения кремнезема в 0.01 М NaOH в образцах исходного носителя и сорбента
<i>Trisopor-500-ПТФЭ (пад.)</i>	49/37	6.0	24	8
<i>Trisopor-500-ПФБД</i>	49/34	7.5	20	17.5
<i>Trisopor-500-ПАНИ</i>	49/42	3.5	25	10
<i>Si-500-ПТФЭ-ГФП</i>	49/37	6	11.5	20
<i>Si-500-ПТФЭ-АА</i>	49/35	7	25.5	5.3
<i>Si-500-ПТФЭ-АС</i>	49/39	5	24	5
<i>Si-500-SO₃-ПАНИ</i>	49/41	4	10	7
<i>Si-500-изо-ПСК- ПАНИ</i>	49/40	4.5	18	8.5
<i>Proligo-500-ПАНИ (озон)</i>	49/32	8.5	8.5	7
<i>Si-500-ФП</i>	49/43	3	10	8
<i>Si-500-ФП-ПАНИ*</i>	49/34	7.5	35	23
<i>Si-500-РА1*</i>	49/42	3.5	15**	10
<i>Si-500-РА6*</i>	49/40	4.5	4	11.5
<i>Si-500-РА7*</i>	49/41	4	20**	9
<i>Si-500-РА8*</i>	49/42	3.5	15**	11.5
<i>Si-500-РА11*</i>	49/45	2	7**	6

объемно-пористых сорбентов исследовали методом ртутной порометрии; долю полимерного компонента в составе композитов определяли методами элементного анализа.

Установлено, что во всех материалах сохраняется пористость, а покрытие образуется не только на внешней поверхности частиц носителя, но и на внутренней поверхности пор, поскольку одновременно сопоставимо уменьшается удельный объем и средний эффективный диаметр пор. Сплошность полимерного покрытия подтверждали высокой стойкостью полученных сорбентов в условиях щелочного гидролиза по сравнению с немодифицированным кремнеземом. Полученные данные приведены в Табл. 3.

Таким образом, разработанные технологические приемы обеспечили получение полимерсодержащих композитов с сохранением пористости исходных носителей различной природы и с равномерно распределенным по поверхности носителей полимерным покрытием.

Глава 5. Применение ФП- и ПАНИ-содержащих композитов в составе разработанных БЭ.

Разработанная методология позволила получать нанотолщинные полимерные покрытия на разнообразных твердых матрицах (дисперсные носители, синтетические мембраны, мультикапилляры и др.), оптимальных для

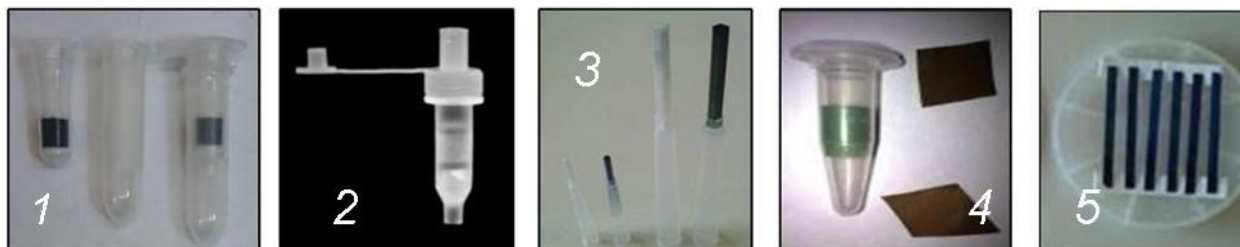


Рисунок 15 - Примеры разработанных БЭ. 1 - спин-картриджи с ПАНИ сорбентом; 2 - двухслойная концентрирующая спин-колонка (верхний очищающий слой – ФП-сорбент, нижний концентрирующий слой – гранулы сшитого полиакриламида); 3 - стеклянные мультикапилляры, покрытые нанослоем ПАНИ, впаянные в наконечник для механического дозатора; 4 - ПАНИ-модифицированная мембрана ММК-2, размещенная в картридже; 5 - кремниевые пластины с 3-АБК-ПАНИ-покрытием для масс-спектрометрии.

решения конкретных задач. Получена линейка материалов, из которых легко выбрать наиболее подходящий вариант для эффективного выделения биополимеров из конкретного биообъекта. На Рис. 15 представлены варианты запатентованных БЭ с разработанными сорбентами.

5.1. Применение разработанных БЭ в пробоподготовке для проведения ПЦР-анализа. Чистые препараты биополимеров (ДНК, РНК, белки, пептиды) используют для решения различных задач с помощью *омиксных* технологий. Задачи, связанные с выделением биополимеров, эффективно решаются с помощью разработанной линейки композитных материалов, демонстрирующих эффект «негативной селекции» в отношении *днДНК*. Входящие в состав этих материалов полимерные покрытия различаются по химической структуре, морфологии поверхностного слоя, по полярности и по наличию остаточных или специально введенных функциональных групп. Эти различия позволяют выбрать конкретный материал для оптимального решения конкретной задачи.

5.1.1. Одностадийное выделение ДНК (РНК) из бактерий (включая микобактерии и микоплазмы) и одноклеточных грибов. За счет высокой сорбционной емкости и селективности ФП- и ПАНИ-содержащих сорбентов удается в одну стадию (Рис. 16) разделять смеси НК и белков, не изменяя состав элюента (и даже в отсутствие такового). Перед выделением НК из биологических образцов последние чаще всего лизируют с целью высвобождения НК. Лизаты содержат ДНК, фрагменты РНК, белки, пептиды, полисахариды, ПАВ, соли, клеточный дебрис и т. д. На картриджи с ПФБД-содержащими сорбентами на основе кремнезема Trisopor™-500 наносили лизаты (по 50 мкл) бактериальных (грамположительных и грамотрицательных

культур - 10^9 клеток/мл); картриджи инкубировали 3 мин при комнатной температуре и центрифугировали (1 мин, 0.24 kg). Выход ДНК в полученных



Рисунок 16 - Схема одностадийного выделения НК и последующего выделения белков (пептидов) с помощью разработанных сорбентов.

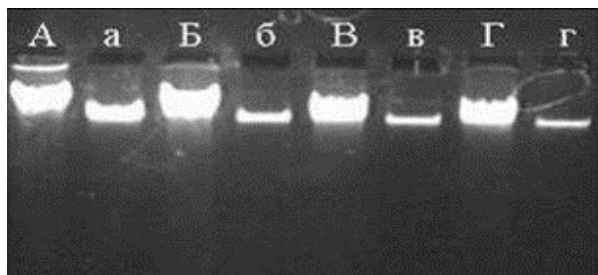


Рисунок 17 - Электрофорез в 0.8 % агарозном геле элюатов, полученных после выделения бактериальной ДНК с помощью ПФБД-сорбента (А – Г) и набора Qia Amp Qiagen (а – г).

А/а – *Escherichia coli*; Б/б – *Bacillus subtilis*; В/в – *Listeria monocytogenes*; Г/г – *Staphylococcus aureus*.

элюатах оценивали по результатам электрофореза (Рис. 17). Для сравнения на гель наносили элюаты, выделенные из тех же лизатов по многостадийному протоколу на картриджах компании Qiagen (Германия). Видно, что элюаты, полученные при использовании набора Qiagen, содержали значительно меньше ДНК, чем при выделении с помощью ПФБД-сорбента. При выделении ДНК из *E. coli* с помощью ПС-SO₃-ПАНИ-кремнезема и *изо*-ПСК-ПАНИ-кремнезема установлено, что белки сорбируется на *изо*-ПСК-ПАНИ-сорбенте эффективнее, чем на ПС-SO₃-ПАНИ-сорбенте. Выход ДНК возрастал пропорционально содержанию протонированных сульфогрупп в комплексе ПСК-ПАНИ, а удерживание белка достигало 99.5%.

При использовании ФП-содержащих сорбентов, полученных на основе озонированного кремнезема, удалось разделить НК, различающиеся вторичной структурой. Сорбенты, модифицированные сополимерами ТФЭ с ГФП, АА и АС, использовали для одностадийного выделения *дн*ДНК и РНК из лизатов *A. tumifaciens* C58 и для разделения компонентом смесей, содержащих *он*ДНК (синтетический олигонуклеотид) и фрагментированную *дн*ДНК. РНК и олигонуклеотиды удерживались в зависимости от полярности поверхности сорбента. Удерживание *он*ДНК и РНК возрастало в ряду ПТФЭ-ГФП - ПТФЭ-АС - ПТФЭ-АА. Выход *дн*ДНК повышался при использовании сорбента с гидроксильными группами по сравнению с материалом, содержащим остатки АА. Выход ДНК в случае ПТФЭ-ГФП-сорбента в среднем был вдвое выше, чем

при использовании ТФЭ-АА- и ТФЭ-АС-материалов. Таким образом, разработанные способы синтеза ФП-содержащих сорбентов с дополнительно введенными функциональными группами позволили создать композиты, способные селективно выделять НК, различающиеся вторичной структурой.

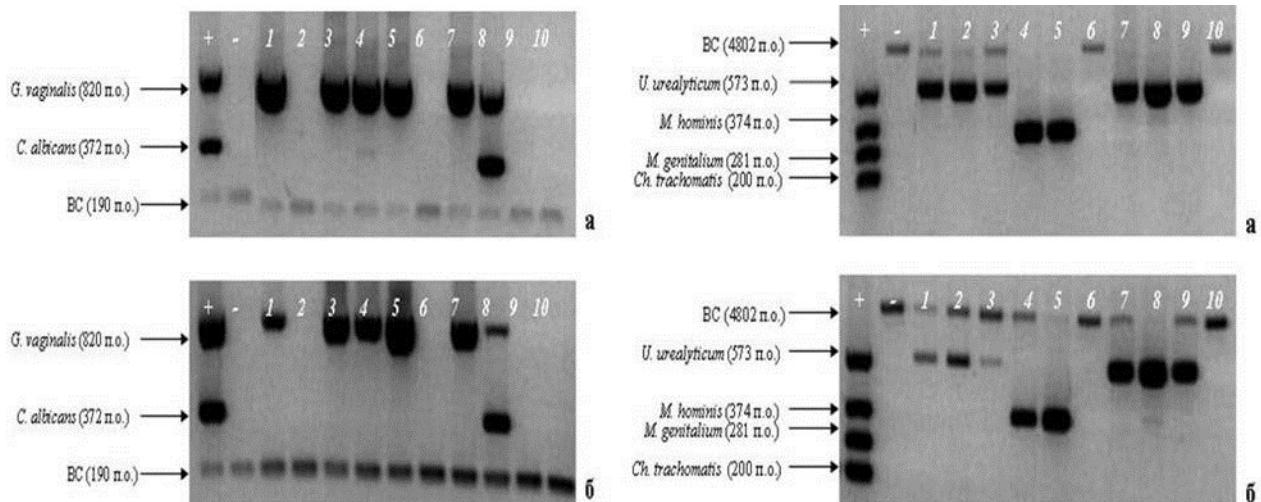


Рисунок 18 - ПЦР-детекция *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* и *Mycoplasma genitalium* в образцах урогенитальных мазков. Результаты электрофореза в 2% агарозном геле. ДНК выделяли с использованием набора Диатом™ДНК Преп 100 («ИзоГен», Россия) (ряд а) и картриджей, упакованных ПАНИ-содержащим сорбентом, полученным на основе носителя, обработанного озоном (ряд б). Стрелки указывают положение ПЦР-фрагментов, относящихся к определяемым возбудителям, а также внутренних стандартов для ряда (а) (190 п.о.) и для ряда (б) (4802 п.о.; «п.о.» – пара оснований).

В клинической ПЦР-диагностике весьма эффективной оказалась пробоподготовка с использованием ПАНИ-сорбентов. Сравнивали протоколы выделения ДНК с помощью набора Диатом™ДНК Преп 100 (ЗАО ИзоГен, Россия - протокол I) с использованием ПАНИ-содержащего сорбента (протокол II). Протокол I более трудоемкий и продолжительный, чем протокол II.

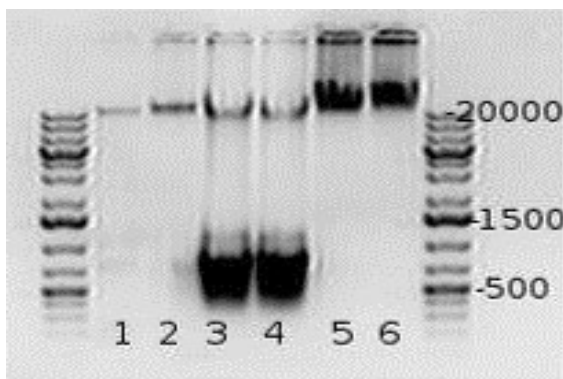


Рисунок 19 - Результаты выделения бактериальной ДНК (*A. tumefaciens* C58; 10^9 клеток/образец) с помощью: 1 - фенол-хлороформной экстракции; 2 - набора компании Nexttec™ GmbH (Германия); 3, 4 - набора «Проба-ГС» (ООО НПО «ДНК-Технология», Россия) без добавления РНКазы; 5, 6 - картриджей с ФП-ПАНИ сорбентом.

Исследовали клинические образцы урогенитальных мазков, случайным образом отобранные у 10 пациентов и обработанные в соответствии с протоколами I и II. Проводили одновременную ПЦР-диагностику двух групп

микроорганизмов, включающих *Gardnerella vaginalis* и *Candida albicans*, а также *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* и *Mycoplasma genitalium*. Из Рис. 18 видно, что чистота ДНК, выделенной по протоколу II (ПАНИ-сорбент), значительно выше, чем по протоколу I, что подтверждается более эффективной амплификацией внутреннего стандарта. Несколько меньший выход ДНК в некоторых образцах по протоколу II объясняется тем, что при использовании ПАНИ-сорбента исходный образец в ходе пробоподготовки разбавляется примерно в 6 раз по сравнению с процедурой по протоколу I. При необходимости степень разбавления образца можно уменьшить, используя более концентрированные лизирующие растворы.

Еще одним важным объектом исследования стал облигатный аэроб – палочковидная агробактерия *Agrobacterium tumefaciens* C58, инфицирующая клетки растений (а в ряде случаев опасная для ВИЧ-инфицированных людей). Сравнивали результаты выделения ДНК на ФП-ПАНИ-сорбенте и с помощью наборов на основе многостадийных процедур выделения (Рис. 19).

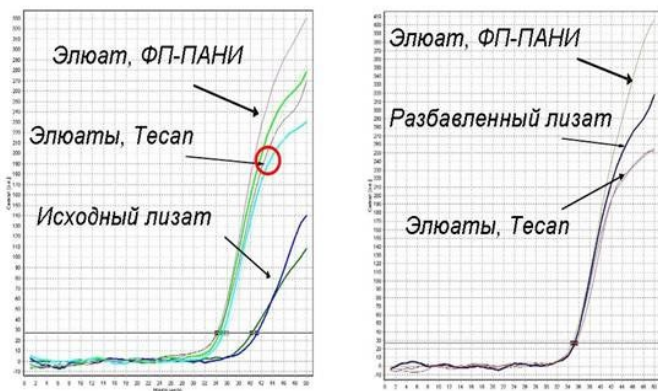


Рисунок 20 - Результаты ПЦР в реальном времени с использованием микобактериальной ДНК, выделенной с помощью ФП-ПАНИ-сорбента из лизатов образцов мокроты, содержащих 600 КОЕ/мл.

Установлено, что одностадийная процедура выделения с использованием ФП-ПАНИ-сорбента обеспечивает значительно более высокий выход ДНК с одновременным отсутствием РНК в получаемых элюатах.

Высокая эффективность применения ФП-ПАНИ-сорбентов в диагностике патогенов человека подтверждена результатами выделения ДНК из *Mycobacterium tuberculosis complex*. Сравнивали количество ДНК, выделенной из образцов мокроты больных туберкулезом на сорбентах и с

помощью роботизированной станции для выделения и амплификации Tecan Freedom EVO® PCR (Tecan Trading AG, Швейцария). Показано (Рис. 20), что образцы, не прошедшие очистку на картридже с сорбентом, амплифицируются значительно хуже. Количество копий ДНК при выделении с помощью ФП-ПАНИ-сорбента во всех случаях значительно превышало количество копий при автоматическом выделении (максимально в 33 раза), притом, что для автоматического выделения брали в 10 раз больше материала. После разведения образца эффективность автоматической амплификации становится сопоставимой по сравнению с образцами, прошедшими очистку на картриджах, однако, даже в этом случае количество копий ДНК при автоматическом выделении составило всего 70% по сравнению с выделением на ФП-ПАНИ-сорбенте. Таким образом, протокол ручного выделения с использованием ФП-

ПАНИ-сорбента предотвращает потери ДНК и обеспечивает эффективную очистку от ингибиторов полимеразы.

5.1.2. Одностадийное выделение НК из вирусов. Разработанные сорбенты эффективны при выделении вирусной ДНК. Так, с помощью ФП-ПАНИ-сорбента выделяли *дн*ДНК вируса гепатита В человека из плазмы крови пяти групп пациентов, различающихся концентрацией вируса. Выделенную ДНК использовали в ПЦР. Показано, что материал одинаково эффективен при выделении ДНК возбудителя из образцов с высоким и с низким содержанием вирусной ДНК. Для оценки эффективности применения ФП-ПАНИ-сорбента при выделении *он*ДНК, выделяли преимущественно циклическую *он*ДНК из вируса гепатита *TTV*, содержащегося в образцах плазмы крови. Воспроизводимость результатов ПЦР с выделенной ДНК достигалась с увеличением числа циклов ПЦР. Таким образом, с помощью ФП-ПАНИ-сорбентов удается эффективно выделять вирусную ДНК с разной третичной структурой.

При использовании картриджей, содержащих ФП-ПАНИ-сорбент, решена задача одностадийного одновременного выделения из образцов крови ДНК человека (выделяли фрагмент человеческого гена, используемый в качестве универсального внутреннего стандарта компанией ЗАО «ДНК-Технология», Россия) и вирусной ДНК фага Т4. Частицы фага Т4 добавляли в образцы непосредственно перед лизисом. Разработано несколько вариантов лизиса. Наиболее эффективный протокол лизиса включал термическую обработку образцов. Параллельно ДНК выделяли с помощью коммерческого набора «Проба-ГС» (ЗАО «ДНК-Технология», Россия). Выделенную ДНК использовали в ПЦР. В методе «Проба-ГС» лизис проводят в присутствии изотиоцианата гуанидина с последующей сорбцией ДНК на немодифицированном кремеземе, отмывкой от загрязняющих примесей и элюцией очищенной ДНК. Показано, что при использовании ПАНИ-содержащего сорбента значения C_t (пороговый цикл амплификации, на котором флуоресценция от расщепленного зонда превышает значение фоновой флуоресценции – *threshold*) при амплификации как человеческой, так и вирусной ДНК заметно уменьшались (на 2.4 при более чем 5-кратном увеличении выхода фрагмента гена человека и на 3.1 при более чем 8-кратном увеличении выхода фрагментов вирусной ДНК) по сравнению с методом «Проба-ГС». Пробоподготовка в соответствии с методом «Проба-ГС» включает около 20 манипуляций, процедура по протоколу II - всего 8 манипуляций.

5.1.3. Выделение ДНК из тканей эукариот (многоклеточных грибов, растений, животных и человека). Показано, что поверхность ПАНИ-содержащих сорбентов эффективно связывает металлсодержащие соединения (ингибиторы ПЦР), такие как гем и хлорофиллы. Поэтому при их использовании не требуется предварительно удалять гемоглобин и его фрагменты (при выделении ДНК из лизатов крови) или хлорофиллы (при выделении ДНК из лизатов тканей растений).

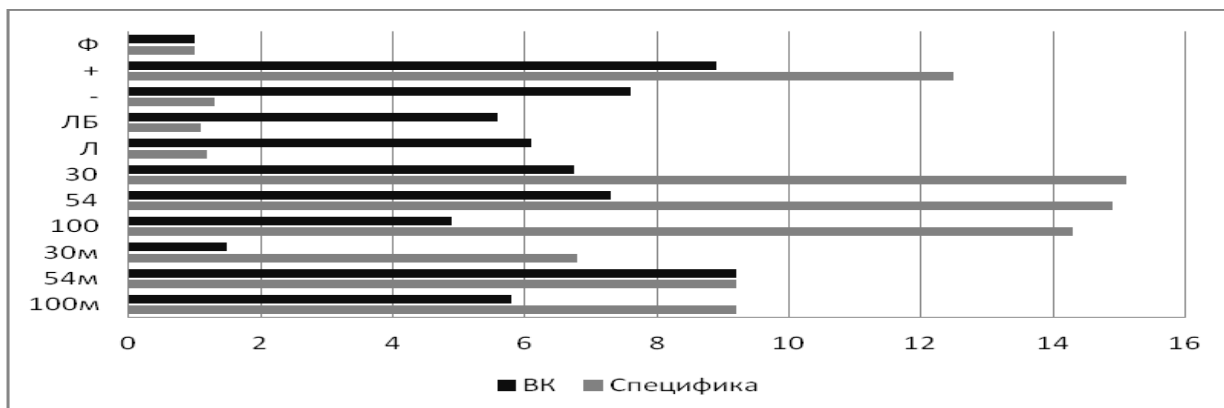


Рисунок 21 - Результаты FLASH-ПЦР элюатов, полученных после выделения ДНК из мицелия *F. Graminearum* и из зараженных этим грибом семян пшеницы на картриджах с ФП-ПАНИ-сорбентом. Интенсивность флуоресценции показана на оси абсцисс, обозначения образцов - на оси ординат. Объемы наносимого на картридж лизата (мкл): 30, 54, 100; «М» - образцы ДНК, выделенные из грибного мицелия; «Л» - неочищенный лизат; «ЛБ» - буфер для лизиса, «-» - вода, «+» - положительный контроль; "Ф" - фон. Черные бары - внутренний контроль, серые бары - специфика.

Образцы ДНК, полученные при пропускании лизатов цельной крови животных и лизатов листьев табака *Nicotiana Tabacum L.* через картриджи с ПАНИ-содержащими сорбентами, не содержали гема или хлорофиллов (отсутствовало поглощение при характеристических длинах волн) и были непосредственно пригодны для проведения ПЦР-анализа.

Высокую связывающую способность в отношении хлорофиллов демонстрируют *изо*-ПСК-ПАНИ-сорбенты (при выделении ДНК из лизатов ткани *Nicotiana Tabacum L.* в получаемых элюатах полностью отсутствуют пики поглощения, соответствующие растительным пигментам).

ФП-ПАНИ-сорбент эффективен при одновременном выделении ДНК из тканей растений и грибов, что доказано результатами одностадийного выделения ДНК фитопатогенного гриба (*Fusarium graminearum*) как из зараженных семян пшеницы, так и непосредственно из мицелия гриба. Увеличение объема наносимого лизата с 30 до 100 мкл (т. е. увеличение содержания ингибиторов полимеразы в образце) не снижало чувствительность и специфичность FLASH-ПЦР (Рис. 21).

5.1.4. Выделение суммарной фракции ДНК из почв. Разработан двухкомпонентный БЭ, содержащий ФП-ПАНИ-сорбент и полиальгинатные частицы. Устройство продемонстрировало высокую эффективность при удерживании гуминовых веществ (мощный ингибитор полимеразы) из почвенных экстрактов. Гидрофобная фракция гуминовых веществ была полностью удержана сорбентом, а эффективность сорбции гидрофильной фракции составила ~ 95 %. Выход суммарной почвенной ДНК, выделяемой за счет эффекта «негативной селекции», составил не менее 94 %.

5.2. Очистка синтетических олигонуклеотидов и ПЦР-фрагментов. ФП-ПАНИ-сорбент эффективен при очистке ПЦР-фрагментов (ампликонов) от

примесей, присутствующих в реакционной смеси после проведения ПРЦ, таких как *Taq*-полимераза (сорбентом удерживается свыше 95%), дНТФ (до 84%), олигонуклеотиды (до 100%) и флуорофоры (до 100%). Для оценки эффективности очистки применяли спектрофотометрию, электрофорез и методы с использованием радиоактивной метки. Очищенные ампликоны можно использовать для клонирования генов, секвенирования НК и т. д.

5.3. Применение ФП-модифицированных композитов в качестве носителя для твердофазного синтеза олигонуклеотидов. Использование частично фторированных полимеров с активными функциональными группами в качестве модификаторов поверхности позволило проводить иммобилизацию биологандов. Разработан носитель для твердофазного синтеза олигонуклеотидов на основе пористого кремнезема, предварительно покрытого нанотолщинным слоем сополимера этилена с метил-3-(1-(дифтор-((трифторэтил)-окси)-метил)-1,2,2,2-тетрафторэтоксид)-2,2,3,3-тетрафторпропанатом (*EVE*; Du Pont, США). Этот сополимер содержит активные эфирные группы, что позволяет использовать их в качестве «якоря»



Рисунок 22 - Получение *EVE*-содержащего носителя для твердофазного синтеза олигонуклеотидов.

для иммобилизации биологандов. Наличие фторированных групп снижает неспецифическую сорбцию синтезируемых олигонуклеотидов на поверхности носителя (за счет эффекта «негативной селекции»). На поверхности *EVE*-модифицированного кремнезема иммобилизовали остатки нуклеозида DMT-dT-SNPE (Proligo GmbH, Германия) за счет взаимодействия с якорными группами в соответствии со схемой на Рис. 22. Поверхностная концентрация нуклеозидных остатков составила ~ 40 мкмоль/г сорбента. На полученном носителе синтезировали олигонуклеотид dT_{20} с выходом около 30 ОЕ/мл (примерно 6 пмоль/мкл). Материал сохранял свои свойства при длительном

хранении при комнатной температуре. В течение 9 месяцев содержание доступных нуклеозидных остатков снизилось всего на 0.86%.

5.4. Применение ФП-модифицированных кремнеземных носителей для определения содержания витаминов в крови. Показано, что кремнеземные носители, поверхностно модифицированные фторопластом 42Л, проявляют себя как мягкие обращено-фазные сорбенты (проявляющие как олео-, так и гидрофобные свойства в зависимости от состава используемого элюента). Таким образом, их можно использовать не только для выделения биополимеров, но также для выделения низкомолекулярных биологически активных веществ (БАВ), различающихся гидрофильно-липофильным балансом. Эффективность применения картриджей с ФП-сорбентом для выделения БАВ продемонстрирована при *совместном* выделении водо- и жирорастворимых витаминов из крови человека. Разработан воспроизводимый метод одновременного выделения производных пяти водорастворимых (С, В₁, В₅, В₆, В₁₂) и четырех жирорастворимых (А, D₃, Е, К) витаминов (витамеров) из одной пробы крови (5 – 10 мл). Из образца крови получали и концентрировали сыворотку, затем проводили жидкофазную экстракцию неполярным растворителем. Органическую фазу упаривали, а сухой остаток растворяли в метаноле. Полученный раствор, как и водную фазу, независимо пропускали через картриджи с ФП-сорбентом, получая элюаты, содержащие, соответственно, смесь жиро- и смесь водорастворимых производных витаминов. Элюаты анализировали с помощью ВЭЖХ. Соотнесение пиков на хроматограмме конкретным компонентам пробы проводили, одновременно регистрируя времена удерживания компонентов и спектры поглощения каждого пика, сравнивая результаты со значениями, полученными в тех же условиях для стандартов определяемых витаминов.

Разработанный способ обеспечивает высокую чувствительность (пределы обнаружения различных компонентов варьируются от 0.001 до 0.1 мкг/мл), а также воспроизводимость ВЭЖХ-анализа производных витаминов, выделенных из крови с помощью ФП-сорбента.

5.5. Применение разработанных ПАНИ-модифицированных композитов в масс-спектрометрии. Введение дополнительных функциональных групп в ПАНИ-покрытия открывает новые возможности для их использования в биоаналитике. Показано, что разделение смесей белков (пептидов) с различными pI можно проводить непосредственно на кремниевой пластине (чипе), покрытой нанослоем сополимера 3-АБК-ПАНИ. Белки с различными pI предварительно метили люминесцентными (с эмиссией при 546, 581 и 610 нм) полупроводниковыми нанокристаллами (CdSe)ZnS. Смесь меченых белков наносили на поверхность модифицированного чипа, систему промывали раствором с определенным pH, удерживание белков на пластине визуализировали в УФ-свете. На пластине удерживались белки с pI < pH отмывочного раствора. Также обнаружено, что анилинсодержащее покрытие поглощает энергию лазерного источника, что позволяет использовать чипы с

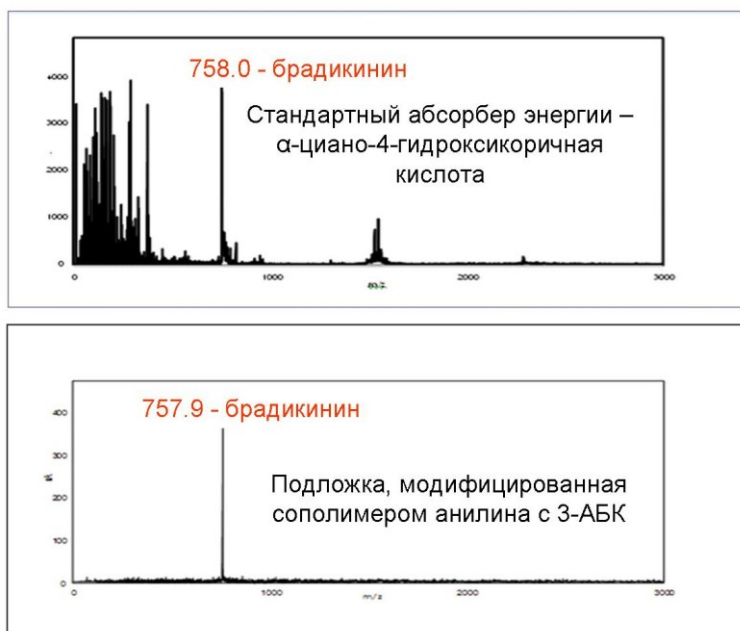


Рисунок 23 - Определение брадикинина методом SELDI-TOF-MS на кремниевых чипах, модифицированных сополимером анилина с 3-АБК.

не наблюдали. Добавление «матрицы» (α -циано-4-гидроксикоричной или горчичной кислот) приводило к появлению интенсивного фона, маскирующего пики низкомолекулярных аналитов. Из Рис. 23 следует, что разработанное покрытие обладает высокой «матричной» активностью и обеспечивает образование протонированных молекулярных ионов ($[M+H]^+$). Таким образом, разработана эффективная аналитическая система для масс-спектрометрии, обеспечивающая удаление примесей из пробы и одновременно повышающая информативность анализа за счет существенного упрощения структуры масс-спектра.

5.6. Области применения разработанных ФП- и ПАНИ-содержащих композитов. Сведения о применимости разработанных материалов в различных областях молекулярной биотехнологии обобщены в Табл. 4, из которой следует, что разработанные сорбенты, во-первых, эффективны при проведении ВЭЖХ смесей, содержащих НК и белки (в аналитическом и в препаративном форматах). Во-вторых, эти материалы, в отличие от известных ранее, обеспечивают одностадийное выделение ДНК (и если необходимо, РНК) из разнообразных биологических образцов. Одностадийное выделение осуществляется благодаря обнаруженному эффекту «негативной селекции» в отношении ДНК и эффекту «позитивной селекции» в отношении белков (пептидов). Также удается последовательно выделять предварительно удержанные сорбентом компоненты белковой фракции.

таким покрытием в масс-спектрометрии в формате SELDI-TOF-MS без добавления к пробе «вещества-матрицы» (например, ароматических кислот), поглощающих энергию и способствующих переводу аналита в газовую фазу. Присутствие «вещества-матрицы» приводит к появлению значительного фонового сигнала в низкомолекулярной части масс-спектра. Напротив, при использовании чипов, покрытых сополимером анилина с 3-АБК, для анализа пептидов (брадикинина и др.) фоновые пики в масс-спектре

Таблица 4 - Области применения разработанных материалов в молекулярной биотехнологии.

Область применения	Материал (полимерный модификатор)				
	Перфтор-полимеры (ПТФЭ)	Частично фторированные полимеры (ПФБД, EVE, ФП и др.)	ПАНИ	Поли-комплексы ПАНИ с ПСК и сополимеры анилина с 3-АБК	Сочетание ФП и ПАНИ
Основные применения					
Разделение смесей НК и белков в ВЭЖХ-формате	+	+	+	+	+
Одностадийное выделение ДНК (РНК) из сложных смесей картриджным методом	+	+	+	+	+
Специальные задачи					
Разделение белковых смесей	+	+	+	+	+
Иммобилизация библигандов	-	+	-	-	-
Рабочие тела для масс-спектрометрии	-	-	+	+	+
Разделение смесей он- и днНК	-	-	-	+	+
Очистка ПЦР-фрагментов	-	-	-	-	+
Анализ содержания витаминов в крови	-	+	-	-	-

С помощью материалов, модифицированных частично фторированными и анилинсодержащими полимерами (в отличие от перфторированных сорбентов) удастся решать особые задачи. Так, нанопокртия на основе частично фторированных полимеров с активными функциональными группами пригодны для иммобилизации библигандов. Материалы, модифицированные фторсодержащими полимерами, перспективны для выделения низкомолекулярных БАВ (например, производных витаминов) из биологических образцов. Композиты, полученные в результате нанесения нанопокртий на основе сополимеров анилина с замещенными анилинами или последовательно покрытые нанослоями ФП и ПАНИ, эффективны при использовании в качестве рабочих тел в масс-спектрометрии, при разделении смесей НК, различающихся третичной структурой, при очистке ПЦР-фрагментов.

Различия в химической структуре фторполимеров и ПАНИ, а также в механизмах полимеризации, в соответствии с которыми получают эти полимеры, очевидны. Тем не менее, неожиданное сходство их сорбционных свойств позволяет рассматривать фторполимер- и ПАНИ-содержащие нанокompозиты в качестве самостоятельного объекта материаловедческих исследований в области нанобиотехнологии. Полученные наноструктурированные композиты обладают комплексом свойств, которые выделяют их среди прочих синтетических сорбентов. Благодаря физико-химическим свойствам фторполимеров и ПАНИ удается формировать сплошные нанотолщинные стойкие покрытия этих полимеров на поверхности твердых матриц в мягких условиях. Процесс формирования покрытий может быть локализован непосредственно в поверхностных слоях носителя. Однако, главное преимущество фторполимер- и ПАНИ-содержащих нанокompозитов перед традиционными сорбционными материалами заключается в их способности разделять смеси НК и белков в одну стадию, в результате чего молекулы НК, не будучи удержанными сорбентом, выделяются в составе исключенного объема, а белковые примеси удерживаются. Это преимущество сложно переоценить. Биосовместимость, высокая селективность при разделении смесей различных классов биополимеров и возможность дополнительной химической модификации позволили не только разработать ряд нетрудоемких и эффективных протоколов использования этих материалов в биотехнологии и молекулярной диагностике, но также расширить области их применения.

Понимание природы уникальных свойств ФП- и ПАНИ-содержащих композитов открывает перспективы для масштабирования технологий производства универсальных полимерсодержащих систем для экспресс-пробоподготовки НК любых биологических объектов (вирусы, прокариоты, эукариоты) из любых биологических образцов (культуральные жидкости, клеточные культуры, лабораторные и клинические пробы, ткани растений, животных и человека, пищевые продукты, пробы воды, воздуха, почвы), совместимых с любыми наборами для ПЦР-диагностики, а также для извлечения микрoпатогенов (вирусы, бактерии) из указанных образцов с целью ранней диагностики заболеваний, а также очистки, хранения и транспортировки биологических проб. Таким образом, разработанные ФП- и ПАНИ-содержащие композиты являются полезным и эффективным инструментом молекулярной биотехнологии.

ВЫВОДЫ

1. Обнаружен и исследован эффект низкой сорбционной активности ряда полимеров (фторполимеры, полианилины, полиарамиды) по отношению к нуклеиновым кислотам (*«негативная селекция»*) при одновременной их высокой сорбционной активности по отношению к белковым компонентам биологических смесей (*«позитивная селекция»*).

2. На основании результатов исследования обнаруженного эффекта впервые разработаны оригинальные одностадийные схемы выделения из

различных источников препаратов нуклеиновых кислот, непосредственно пригодных для ПЦР-анализа, а также белков и др. биологически-активных соединений для иных биомедицинских исследований.

3. Исследован механизм селективной сорбции ДНК, РНК и белков на поверхности разработанных полимерных покрытий в статических и динамических условиях. Установлено, что сорбционные свойства покрытий исследованных полимеров определяются суммарным вкладом различных механизмов сорбции, происходящей в результате гидрофобных взаимодействий, ионных взаимодействий и образования водородных связей. Показано, что количественные параметры сорбции зависят как от химической структуры полимерного слоя в составе сорбента, так и от природы молекул сорбата, и в значительно меньшей степени – от морфологии поверхности сорбента.

4. Разработаны технологичные масштабируемые методы получения твердых композиционных сорбентов, представляющих собой как пористые, так и непористые носители, модифицированные функциональными нанотолщинными слоями полимеров, демонстрирующих эффект «*негативной селекции*» в отношении молекул нуклеиновых кислот.

5. С помощью разработанных методов получена серия композиционных сорбентов (фторполимер-, ПАНИ- и плиарамид-модифицированных), отличающихся как химическим строением полимерных модификаторов, так и природой носителя; разработана линейка биосепарирующих элементов различной конструкции, содержащих полученные сорбенты.

6. Продемонстрирована высокая эффективность и универсальность применения биосепарирующих элементов, содержащих разработанные сорбенты, с целью одностадийного выделения нуклеиновых кислот из биологических проб, различающихся по происхождению (вирусы, прокариоты, эукариоты), источнику (бактериальные культуры, биологические жидкости, ткани грибов, растений и животных, почвенные экстракты, пищевые продукты и др.) и способу подготовки (лизаты, экстракты, фильтраты, смывы и пр.).

7. Доказана практическая ценность разработанных способов пробоподготовки с использованием полученных сорбентов для ПЦР-диагностики бактериальных и дрожжевых урогентиальных инфекций, социально-опасных бактериальных и вирусных инфекций (таких как туберкулез человека, гепатит В, гепатит *ТТV*), а также фитопатогенных грибов, вызывающих фузариоз.

8. Продемонстрирована высокая эффективность разработанных полимерсодержащих композитов в качестве носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов и сорбентов для одновременного выделения жирорастворимых витаминов из крови человека, а также в качестве «рабочих тел» для масс-спектрометрии.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. A.D. Kataev, O.A. Reznikova, **D.V. Kapustin**, V.P. Zubov: Polytrifluorostyrene-coated silica as a packing for column liquid chromatography // *J. Chromatogr. A*. - 1994. – V. 660. - P. 131-136.
2. В.К. Иванов, А.Н. Баранов, **Д.В. Капустин**, Ю.Д. Третьяков. Формирование фрактальной структуры поверхности порошков Fe_2O_3 // *Неорганические материалы*. – 1997. - Т. 33(7). - С. 830 - 834.
3. **Д.В. Капустин**, В.В. Сабуров, Л.Л. Завада, А.В. Евстратов, Г.Б. Барсамян, В.П. Зубов. Композиционные фторполимерсодержащие сорбенты для выделения и очистки биополимеров // *Биоорганическая химия*. – 1998. - Т. 24(11). - С. 868 - 876.
4. **Д.В. Капустин**, Е.Ю. Ягудаева, Л.Л. Завада, Л.С. Жигис, В.П. Зубов, Е.М. Ярошевская, Л. Плюбнер, Р.-М. Лайзер, Г. Брем. Композиционный полианилинсодержащий кремнеземный сорбент для выделения ДНК // *Биоорганическая химия*. - 2003. - Т. 29(3). – С. 310 - 315.
5. **D.V. Kapustin**, A.A. Vikhrov, I.V. Gorokhova, A.N. Generalova, O.A. Kalyazina, T.G. Murzabekova, and V.P. Zubov. Multicomponent thermosensitive systems for biocatalysts // *Russian Chemical Bulletin, International Edition*. - 2005. - V. 54(2). – P. 452 – 457.
6. E.Yu. Yagudaeva, M.R. Muysdinov, **D.V. Kapustin**, V.P. Zubov. Oxidative polymerization of aniline on the surface of insoluble solid poly (sulfonic acids) as a method for the preparation of efficient bioadsorbents // *Russian Chemical Bulletin, International Edition*. - 2007. - V. 56(6). – P. 1166 - 1173.
7. Zubov V.P., **Kapustin D.V.**, Generalova A.N., Yagudaeva E.Yu., Vikhrov A.A., Sizova S.V., Muysdinov M.R. Modification of Solids with Polymer Nanolayers as a Process for Manufacture of Novel Biomaterials // *Polymer Science Series A*. – 2007. – V. 49(12). – P. 1247-1264.
8. E.Yu. Yagudaeva, Ya.A. Bukina, A.I. Prostyakova, V.P. Zubov, V.A. Tverskoy, **D.V. Kapustin**. Oxidative Polymerization of Aniline on the Surface of Silica in the Presence of Poly(sulfonic acids) as a Method of Preparing Efficient Biosorbents // *Polymer Science, Ser. A*. - 2009. - V. 51(6). P. 675 – 682.
9. В.П. Зубов, И.П. Чихачева, Е.И. Николаева, **Д.В. Капустин**, Е.Ю. Ягудаева, И.В. Кубракова. Применение микроволнового излучения для синтеза композиционных сорбентов на основе кремнезема, модифицированного поливиниловым спиртом // *Журнал общей химии*. - 2009. - Т. 79(2). С. 203 – 206.
10. **D.V. Kapustin**, A.I. Prostyakova, D.Yu. Ryazantsev, V.P. Zubov. Novel composite matrices modified with nanolayers of fluoropolymers as perspective materials for separation of biomolecules and bioanalysis // *Nanomedicine*. – 2011. - V. 6(2). - P. 241 - 255.
11. **Д.В. Капустин**, В.П. Зубов. Синтез универсальных биосовместимых фторполимер- и полианилинсодержащих нанокомпозитов и их применение в биосепарации и биоанализе // *Вестник МИТХТ* (юбилейное издание). - 2011. - Т. 6(5). - С. 21 - 46.
12. **Kapustin D.**, Prostyakova A., Bryk Ya., Yagudaeva E., Zubov V. New Composite Materials Modified with Nano-Layers of Functionalized Polymers for Bioanalysis and Medical Diagnostics. In: Cuppoletti J. (Ed.) / *Nanocomposites and polymers with analytical methods*. – 2011. – Intech: Croatia. P. 83 - 106.
13. **Kapustin DV**, Prostyakova AI, Zubov VP. Fluoroplast-polyaniline-coated adsorbent for one-step isolation of DNA for PCR detection of viral hepatitides (HBV and TTV) // *Bioanalysis*. – 2014. – V. 6(7). – P. 957 – 966.
14. E. Yu. Yagudaeva, D.-J. Liaw, A. A. Ischenko, V. N. Bagratashvili, V. P. Zubov, A. I. Prostyakova, D. Yu. Ryazantsev, A.P. Sviridov, **D.V. Kapustin**. New polyamide-containing sorbents for one-step isolation of DNA // *J. Mater. Sci*. – 2014. – V. 49. P. 3491 - 3496.

15. Зайцева И.П., Серебрянский Е.П., Скальная М.Г., **Капустин Д.В.** Аминокислотный и витаминный профили сыворотки крови студентов ВУЗа, занимающихся спортом // *Вестник восстановительной медицины*. - 2014. Т. 2(60). С. 62 - 65.
16. **Д. В. Капустин**, А. И. Простякова, Я. И. Алексеев, Д. А. Варламов, В. П. Зубов, С. К. Завриев. Одностадийное выделение ДНК *Mycobacterium tuberculosis* на фторопласт-полианилинсодержащем сорбенте для ПЦР-диагностики // *Acta Naturae*. – 2014. – V. 6 № 2 (21). - С. 6 - 10.
17. Der-Jang Liaw, Elena Yagudaeva, Anna Prostyakova, Michael Lazov, Dmitry Zybin, Anatoly Ischenko, Vitaly Zubov, Cheng-Hung Chang, Ying-Chi Huang, **Dmitry Kapustin**. Sorption behavior of polyaramides in relation to isolation of nucleic acids and proteins // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2016. – V. 145. – P. 912 - 921.
18. Elena Yagudaeva, Dmitry Zybin, Alexander Vikhrov, Anna Prostyakova, Anatoly Ischenko, Vitaly Zubov, **Dmitry Kapustin**. Sorption of nucleic acids and proteins on polyaniline and polyaramide nano-coatings as studied with spectral-correlation interferometry method in a real time mode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018. – V. 163. – P. 83 - 90.
19. Д.-Дж. Льяо, Д.И. Зыбин, А.И. Простякова, Е.Ю. Ягудаева, А.А. Вихров, А.А. Ищенко, В.П. Зубов, **Д.В. Капустин**. Статическая и динамическая сорбция нуклеиновых кислот и белков на поверхности сорбентов, модифицированных нанотолщинными слоями полимеров // *Известия ВУЗов. Химия и химическая технология*. – 2018. - Т. 61(1). С. 4 - 22.

Патенты:

20. Leiser R.-M., Plobner L., Yaroshevskaya E. M., Zubov V. P., **Kapustin D. V.**, Yagudaeva E. Yu. Use of a composite polymer-coated sorbent for separation, purification, desalting and concentration of biopolymers. Patent WO 0064579 (A1), 14.09.2006.
21. Zubov V.P., Plobner L., **Kapustin D.V.**, Balayan H., Muysdinov M., Brem G., Leiser R.-M. Sorbent material having a covalently attached perfluorinated surface with functional groups. Patent US 2006243658, 02.11.2006.
22. Leiser R.-M., **Kapustin D.V.**, Zubov V.P., Balayan H., Plobner L., Brem G. A composite polymer-coated sorbent with a bidisperse pore size distribution for the simultaneous separation and desalting of biopolymers. Patent US 20070293394A1, 20.12.2007.
23. **Kapustin D.V.**, Zavada L.L., Barsamjan G.B., Ponomarev N.N., Zubov V.P., Leiser R.-M., Plobner L., Yarochevskaia E.M. New hydrophobic polymer comprising fluorine moieties. Patent US 20080015341A1, 01.17.2008.
24. Vaccine-Shlosser G., Ribbing C., Bachman P.K., Zubov V.P., **Kapustin D.V.** Surface coating for laser desorption ionization mass spectrometry of molecules. 2011. Patent WO 2011004308 (A1).
25. Скибина Ю.С., Белоглазов В.И., Тучин В.В., **Капустин Д.В.**, Простякова А.И. Многоканальный наконечник для экстракции нуклеиновых кислот, белков и пептидов. Патент РФ № 2547597 от 12.03.2015.
26. **Д.В. Капустин**, А.В. Тарасов, А.И. Простякова, С.А. Лепешин. Сорбционная композитная мембрана и биосепарирующее устройство для выделения ДНК. Патент РФ № 2631934 С1 от 28.09.2017.

Глава в монографии:

27. **Kapustin, D. V.**, Yagudaeva, E. Y., Zubov, V. P., Muysdinov, M. R., Yaroshevskaja, E. M., Plobner, L., Leiser, R.-M., Brem G. New Polymer-Coated Materials for One-Step Separation of Nucleic Acids. In: Corey R. Woods (Ed.) / *Frontiers in DNA Research*. – 2006. - Nova Science Publishers, USA. ISBN: 1-59454-925-7. P. 113 -136.