

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 ПОЛИАНИЛИНСОДЕРЖАЩИЕ
КОМПОЗИТЫ КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ**

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

Диссертация на соискание ученой степени
доктора химических наук

Научный консультант:
доктор химических наук, профессор
Зубов Виталий Павлович

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. МЕТОДЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ; ПРИМЕНЯЕМЫЕ НОСИТЕЛИ, СОРБЕНТЫ И ПОЛИМЕРНЫЕ МОДИФИКАТОРЫ (обзор литературы)	24
1.1. Методы подготовки образцов для выделения биополимеров из биологических смесей; основные способы выделения НК	24
1.2. Носители для получения поверхностно-модифицированных сорбентов	44
1.2.1. Носители на основе кремнезема	44
1.2.2. Стеклообразные мультикапилляры – перспективный носитель для создания полимермодифицированных композитов и микрофлюидных устройств	47
1.2.3. Синтетические мембраны как перспективный носитель для получения полимерсодержащих сорбентов	49
1.3. Полимерсодержащие сорбенты для выделения и очистки биологически активных соединений. Методы получения, модификаторы и области применения	51
1.3.1. Сорбенты, получаемые в результате физической адсорбции или хемосорбции полимеров на поверхности носителя	51
1.4. Сорбенты с привитой полимерной фазой	59
1.5. Силаминированные кремнеземы как носители для получения полимерсодержащих композитов	64
1.6. Композиционные сорбенты, содержащие нетрадиционные полимерные фазы	66
1.7. Полианилин как модификатор поверхности при получении композиционных материалов	75
1.7.1. Строение ПАНИ и механизм окислительной полимеризации анилина	76
1.7.2. Полимеризация анилина в присутствии твердых подложек	82
1.7.3. Полимеризация анилина в присутствии растворимых полисульфокислот	87
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ИСПОЛЬЗОВАННАЯ АППАРАТУРА, РАЗРАБОТАННЫЕ МЕТОДИКИ СИНТЕЗА СОРБЕНТОВ И ПРОТОКОЛЫ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	92
2.1. Носители для синтеза сорбентов	92
2.2. Полимерные модификаторы	93
2.3. Прочие реагенты	94
2.4. Растворители	95
2.5. Биополимеры (включая ферменты)	95
2.6. Биологические образцы	95
2.7. Аппаратура	96
2.8. Методы синтеза композиционных сорбентов на основе кремнезема	97

2.9. Модифицирование стеклянных мультикапилляров (МК) нанослоями ПАНИ	105
2.10. Модифицирование полимерных синтетических мембран нанослоями ПАНИ и сборка БЭ, содержащих мембранный сорбент	106
2.11. Получение сополимеров ПАНИ-3-АБК	106
2.12. Оценка гидролитической стабильности сорбентов	107
2.13. Ртутная порометрия	108
2.14. Определение элементного состава образцов сорбентов	109
2.15. Протокол лизиса бактериальных культур, урогенитальных мазков и мокроты	110
2.16. Протокол лизиса образцов цельной крови человека и млекопитающих ..	110
2.17. Протокол лизиса цельной крови с целью выделения лейкоцитарной ДНК	111
2.18. Протоколы лизиса тканей растений и грибов	111
2.19. Протокол лизиса компонентов почвы	112
2.20. Протоколы выделения ДНК с помощью БЭ, содержащих разработанные полимерсодержащие сорбенты	113
2.21. Полимеразная цепная реакция	114
2.22. Очистка ПЦР-фрагментов	115
2.23. Разделение смесей <i>он</i> - и <i>дн</i> ДНК.....	115
2.24. Определение белка методом Бредфорда	116
2.25. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ)	116
2.26. Высокоэффективная жидкостная хроматография	116
2.27. Получение полиальгинатных сфер	117
2.28. Протокол выделения витаминов (витамеров) из цельной крови	117
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ	
ПОЛИАРАМИД-, ФТОРПОЛИМЕР- И ПАНИ-СОДЕРЖАЩИХ	
ПОКРЫТИЙ.....	123
3.1. Сходство и различия в сорбционных свойствах фторполимерных и ПАНИ-покрытий	124
3.2. Морфология, химический состав и заряд поверхностного слоя исследуемых полимерных покрытий	126
3.2.1. Объекты исследования	127
3.2.2. Особенности морфологии поверхности полученных полимерных покрытий	129
3.2.3. Химический состав и заряд поверхностного слоя исследуемых полимерных покрытий	131
3.3. Сорбционные свойства полимерных покрытий в отношении нуклеиновых кислот и белков	136
3.3.1. Удерживание биополимеров полученными сорбентами в режиме статической сорбции	137
3.3.2. Удерживание биополимеров полученными сорбентами в режиме динамической сорбции	146

3.4. Вероятные механизмы сорбции НК и белков на исследованных сорбентах.....	157
3.5. Выводы из результатов исследования сорбционных свойств полимерных сорбентов	159
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧНЫХ СПОСОБОВ СИНТЕЗА ПОЛИМЕРСОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛУЧЕННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ ПОКРЫТИЙ	162
4.1. Разработка технологичных способов получения ПФБД-, ФП-, полиарамид- и ПАНИ-содержащих композиционных сорбентов	166
4.1.1. Получение композиционных сорбентов в присутствии неактивированного носителя или с получением прекурсора	167
4.1.1.1. Получение ПАНИ-содержащего композита путем химического осаждения полимерного нанослоя	167
4.1.1.2. Получение композиционных полимерсодержащих сорбентов методом кастинга	172
4.1.1.2.1. Получение ПФБД-содержащего сорбента методом кастинга с последующим фторированием	173
4.1.2. Получение полимерсодержащих сорбентов в присутствии активированных носителей	187
4.1.2.1. Получение ПАНИ-сорбентов на основе кремнеземов, модифицированных сульфированным сополимером стирола с дивинилбензолом	187
4.1.2.2. Получение ПАНИ-содержащих кремнеземных сорбентов в результате матричной полимеризации анилина в присутствии иммобилизованных полисульфоокислот	192
4.1.2.3. Синтез кремнеземных сорбентов, модифицированных сополимерами анилина с замещенными анилинами	199
4.1.2.4. Озон-индуцированная полимеризация на поверхности твердых носителей	201
4.1.2.5. ПАНИ-содержащие сорбенты на основе гидрофобизованного носителя	208
4.2. Способы получения ПАНИ-содержащих композитов на основе не кремнеземных носителей	211
4.2.1. Получение ПАНИ-содержащих сорбционных материалов на основе стеклянных мультикапилляров	211
4.2.2. Синтетические мембраны в качестве носителей при получении ПАНИ-содержащих сорбционных материалов	218
4.3. Морфология, химический состав и гидролитическая стабильность полученных сорбентов	227
ГЛАВА 5. ПРИМЕНЕНИЕ ФП- И ПАНИ-СОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИТОВ В СОСТАВЕ РАЗРАБОТАННЫХ БИОСЕПАРИРУЮЩИХ ЭЛЕМЕНТОВ	232
5.1. Применение разработанных биосепарирующих элементов в пробоподготовке для проведения ПЦР-анализа	235

5.1.1. Одностадийное выделение ДНК (РНК) из бактерий (включая микобактерии и микоплазмы) и одноклеточных грибов	235
5.1.2. Одностадийное выделение ДНК (РНК) из вирусов	265
5.1.3. Выделение ДНК из тканей эукариот (многоклеточных грибов, растений, животных и человека)	276
5.1.4. Выделение суммарной фракции ДНК из почв	287
5.2. Очистка синтетических олигонуклеотидов и ПЦР-фрагментов	293
5.3. Применение ФП-модифицированных композитов в качестве носителя для твердофазного синтеза олигонуклеотидов	303
5.4. Применение ФП-модифицированных кремнеземных носителей для определения содержания витаминов в крови	309
5.5. Применение разработанных ПАНИ-модифицированных композитов в масс-спектрометрии	323
5.6. Области применения разработанных ФП- и ПАНИ-содержащих композитов	333
ВЫВОДЫ	337
ПРИЛОЖЕНИЯ	339
БЛАГОДАРНОСТИ	343
СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	345

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АА	– аллиламин
3-АБК	– 3-аминобензойная кислота
АГМ-9, ГАПТЭС	– γ -аминопропилтриэтоксисилан
АС	– аллиловый спирт
БАС	– биологически активные соединения
БСА	– бычий сывороточный альбумин
БЭ	– биосепарирующий элемент
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
ВЭЖХ	– высокоэффективная жидкостная хроматография
ГМА	– глицидилметакрилат
ГМДА	– гексаметилендиамин
ГФД	– (гептадекафтордецил)диметилсилан
ДВБ	– дивинилбензол
ДМСО	– диметилсульфоксид
ДМФА	– диметилформаид
<i>дн</i> ДНК	– двунитевая ДНК
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ДЭАЭ	– диэтиламиноэтил
ИК	– инфракрасный (ая)
<i>к</i> ДНК	– комплементарная ДНК
КДИ	– карбодиимид
КМЭТС	– 2-(карбометокси)-этилтрихлорсилан
МК	– мультикапилляры
МКМ	– мембрана капроновая микрофльтрационная
ММК	– мембрана микрофльтрационная капроновая
ММПА+	– мембрана микрофльтрационная полиамидная с положительным поверхностным зарядом
МПС	– макропористое стекло, мембрана полиэфирсульфоновая
<i>м</i> РНК	– матричная РНК
МС	– масс-спектрометрия
МФФК	– микрофльтрационная фторопластовая композиционная мембрана
МФФК-Г	– микрофльтрационная фторопластовая композиционная мембрана гидрофобная
НК	– нуклеиновые кислоты
<i>он</i> ДНК	– одонитевая ДНК
ПА	– полиарамиды
ПА-66	– мембрана полигексаметиленадипинамидная
ПАА	– полиакриламид
ПААГ	– полиакриламидный гель
ПАБК	– поли-3-аминобензойная кислота
ПАМПСК	– поли(2-акриламидо-2-метил-1-пропан)сульфоновая кислота
ПАНИ	– полианилин
ПП	– полипропилен
ПС	– полистирол
ПСА	– персульфат аммония
ПСК	– полисульфокислота
ПТФС	– политрифторстирол
ПТФЭ	– политетрафторэтилен

ПФБД	– полифторбутадиен
ПХТФЭ	– полихлортрифторэтилен
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ПЭИ	– полиэтиленимин
ПЭО	– полиэтиленоксид
РНК	– рибонуклеиновая кислота
РФЭС	– рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия
РЭМ	– растровая электронная микроскопия
СДСП	– средняя длина свободного пробега
СКИ	– спектрально-корреляционная интерферометрия
ТГФ	– тетрагидрофуран
<i>m</i> РНК	– транспортная РНК
ТФЭ	– тетрафторэтилен, твердофазная экстракция
ТЭА	– триэтиламин
ТЭ-буфер	– буферный раствор, содержащий 10 мМ Трис·НСl (рН 8.2) и 1 мМ ЭДТА
УФ	– ультрафиолетовый (ая)
ФП	– фторполимер
ХМК	– химически модифицированные кремнеземы
ЭДМА	– этилендиметакрилат
ЭПР	– электронный парамагнитный резонанс
<i>bp</i>	– пара [гетероциклических] оснований
CS	– cross-section
dNTP	– дезоксинуклеотидтрифосфат
ESI	– электрораспылительная ионизация
IMFP	– inelastic mean free path (средняя длина свободного пробега)
<i>kb</i>	– тысяча пар [гетероциклических] оснований
<i>kg</i>	– тысяча <i>g</i> [ускорение свободного падения]
LIGA	– Lithographie, Galvanoformung and Abformung (нем.) или Lithography, Electroplating, and Molding (англ.) - методы, основанные на использовании литографии, гальваностегии и формования литьем
MALDI	– активированная матрицей лазерная десорбция/ионизация
MS	– mass-spectrometry
Ni-NTA	– никель-нитрилотриацетатная агароза
SEAC	– хроматографическое предфракционирование образца на аффинной поверхности
SELDI	– ионизации за счет лазерной десорбции, усиленной поверхностью
SEND	– усиленная поверхностью беспримесная десорбция
TOF	– time of flight (анализатор времени полета)

ВВЕДЕНИЕ

Биотехнология в качестве самостоятельного научного направления оформилась в двадцатых годах прошлого века, и сначала развивалась как сельскохозяйственная, а затем как научно-промышленная дисциплина, решая проблемы повышения эффективности обработки биологического сырья, оптимизации условий ферментации и биотрансформации, а также очистки конечного продукта. Спустя примерно полвека благодаря развитию технологии рекомбинантных ДНК сущность биотехнологии радикально изменилась, поскольку появилась возможность создавать новые микроорганизмы и эукариотические клетки, производящие необходимые человеку 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 (Рисунок 1).

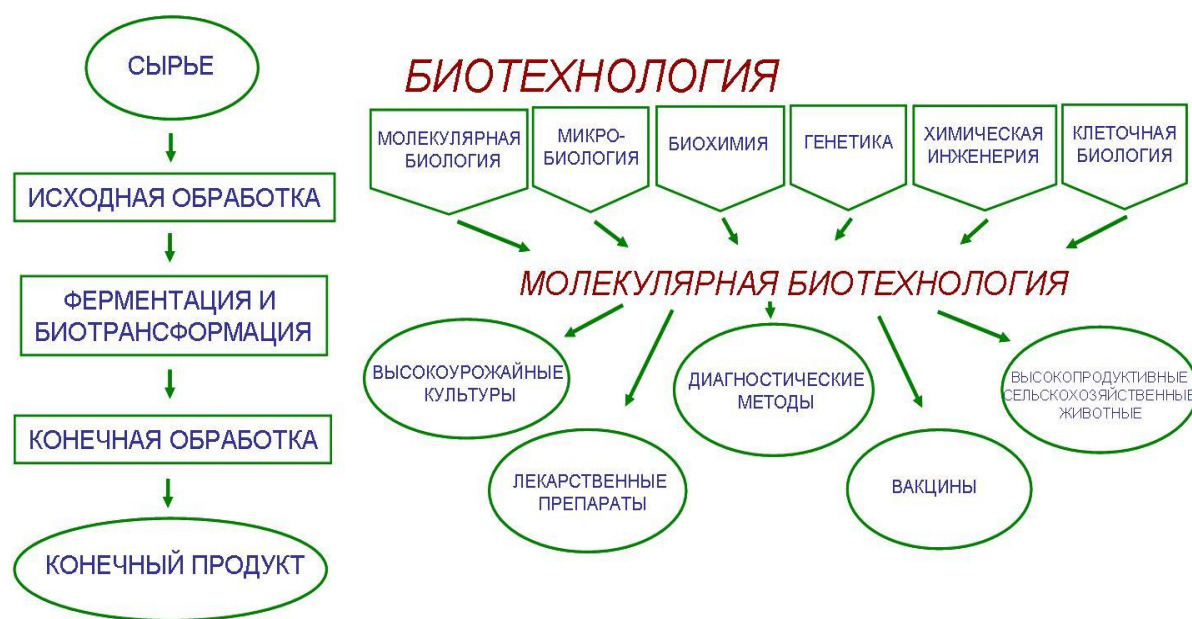


Рисунок 1 - Направления молекулярной биотехнологии [1].

Одно из наиболее практически значимых направлений современной биотехнологии основано на использовании молекулярно-генетических технологий в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний, что стало возможным благодаря открытию в середине 80-х гг. XX в. процесса искусственного многократного копирования ДНК, известного как полимеразная цепная реакция (ПЦР) [2]. Широкое использование методов молекулярной диагностики (наряду с

традиционными микробиологическими и иммунологическими методами) в практике исследовательских и клинических лабораторий определяет постоянно растущую потребность в удовлетворительно очищенных препаратах нуклеиновых кислот (НК) и белков. Мировой рынок *in-vitro* диагностики, по ряду оценок, к 2019 г. составит более 75 миллиардов долларов США. При этом рынок диагностикумов только на основе тестирования НК уже составляет более 15% от общего объема.

ПЦР-анализ стал рутинной процедурой для определения специфических полинуклеотидных последовательностей благодаря своей универсальности и высокой чувствительности. ПЦР-метод широко применяют при диагностике инфекционных заболеваний [3], генотипировании и исследовании свойств патогенных микроорганизмов [4], при анализе генетических мутаций, с целью идентификации личности [5]. С помощью ПЦР-диагностики стало возможным определять некультивируемые виды микроорганизмов (например, *Mycobacterium leprae*, *Treponema palladium* и ряда вирусов, таких как вирусы папилломы человека и гепатита С) [6].

Преимущества, обеспечиваемые методом ПЦР, очевидны. Однако до сих пор серьезной проблемой оказывается выбор конкретного способа подготовки образца к исследованию, поскольку до последнего времени не существовало универсального подхода к выделению НК разных видов организмов из различных биологических источников. Ручные методики, позволяющие выделить и сконцентрировать ДНК (РНК) для ПЦР-анализа, трудоемки, сопровождаются потерями выделяемой НК на каждом этапе процедуры, и увеличивают риск контаминации образцов. Автоматизированные методы пробоподготовки часто не обеспечивают требуемый уровень чувствительности. В целом, сказанное относится и к методам выделения веществ белковой природы (прежде всего ферментов и биологически активных пептидов), когда присутствие различных примесей в выделенном образце может существенно снизить эффективность их применения в медицинской диагностике или биоинженерии.

В результате совершенствования т. н. *омиксных технологий* к способам выделения и очистки биополимеров (т. е. к методам пробоподготовки) стали предъявлять дополнительные требования. Если ранее такие требования относились, в основном, к степени очистки и количественному выходу биополимера, выделяемого в нативном состоянии, то сегодня также необходимо учитывать сокращение времени, затрачиваемого на процесс выделения (за счет уменьшения числа этапов пробоподготовки), возможность его автоматизации, роботизации и миниатюризации

применяемых для этого систем, с одновременным максимальным упрощением процедуры выделения.

Методы выделения биополимеров из биологических смесей основаны на специфических различиях в растворимости (и/или в сродстве к сорбенту) выделяемых соединений и прочих компонентов смеси и включают жидкостную экстракцию, осаждение и адсорбцию с использованием различных сорбентов. Как правило, эти методы многостадийны, трудоемки и часто сопровождаются потерями выделяемого компонента. Методы с применением сорбентов (такие как хроматография, твердофазная экстракция) основаны на концепции «улавливания» и удерживания целевого биополимера сорбентом на первом этапе разделения («*позитивная селекция*»), вслед за этим необходимо смывать прочие 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 удается строго количественно воспроизвести результат процедуры выделения.

Очевидна актуальность исследований, направленных на разработку 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.) в практике клинических лабораторий широко применялась ПЦР-диагностика, но не были разработаны протоколы пробоподготовки для выделения биополимеров, основанные на «негативной селекции». Было известно, что перфторполимерсодержащие сорбенты, в частности, получаемые методом *радиационной* прививочной полимеризации, эффективны при одностадийном выделении НК из сложных биологических смесей. Это было первым примером, демонстрирующим принципиальную возможность реализации эффекта «негативной селекции» при выделении НК. Однако аналогичные свойства материалов, модифицированных другими, в том числе, частично фторированными полимерами, не были продемонстрированы.

Было также известно, что в результате полимеризации анилина в присутствии твердых подложек на их поверхности формируются устойчивые полианилиновые (ПАНИ) покрытия, селективные в отношении сорбции различных заряженных ионов и молекул. Однако ПАНИ-модифицированные материалы еще не применяли для

разделения компонентов смесей биополимеров.

В силу своих физико-химических свойств фторполимеры (ФП) и полианилины не пригодны для получения пористых сорбентов с удовлетворительными прочностными и морфологическими характеристиками. Решение может быть найдено в получении композитов, сочетающих жесткость и контролируемую пористость твердой подложки с уникальными сорбционными свойствами полимерного нанопокрывтия, сформированного на поверхности носителя.

С целью получения таких композитов было необходимо разработать масштабируемые технологии, обеспечивающие формирование нанотолщинных полимерных покрытий на поверхности носителей, в том числе, *прямой синтез* наноструктурированных композитов. Параллельно было необходимо разработать эффективные конструкции *биосепарирующих элементов* - БЭ (в качестве альтернативы хроматографическим колонкам), такие как компактные одноразовые картриджи с дисперсным сорбентом и устройства, в которых в зависимости от состава пробы и цели выделения биополимера целесообразно использовать модифицированные полимерами капилляры, синтетические мембраны, твердые 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 биополимеров (максимальный выход, необходимая степень очистки, минимальное число манипуляций, минимальное затрачиваемое время).

Таким образом, имелись предпосылки для разработки высокотехнологичных 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 «негативную селекцию» в отношении НК 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 новизну и актуальность проведенного исследования.

Прежде, чем перейти к постановке задачи настоящего исследования и обсуждению полученных результатов, представляется важным обратить внимание на особенности применяемых в лабораторной практике способов выделения и очистки биополимеров, в частности, НК и белков.

В основу наиболее общей классификации методов разделения компонентов смесей, содержащих биополимеры, могут быть положены четыре физико-химических процесса, а именно: экстракция, осаждение, адсорбция и хроматография (являющаяся, по сути, комплексным методом, в котором реализуются перечисленные процессы). При этом, в подавляющем большинстве случаев (включая методы твердофазной экстракции) эффективность разделения обусловлена присутствием в системе носителя, имеющего оптимальную морфологию и необходимые физико-химические и сорбционные поверхностные свойства. Очевидно, что многообразие структур и функциональных свойств биологически активных соединений (БАС) определяет весьма широкий выбор синтетических носителей, применяемых при выделении, очистке и/или разделении смесей БАС. В случаях, когда выделяемыми веществами являются биополимеры, к методам выделения, в частности, к используемым носителям, предъявляются специфические требования, учитывающие особенности строения и свойства выделяемых макромолекул (в частности, их лабильность, возможность возникновения многоточечного контакта с поверхностью носителя, неравномерность распределения по полимерной цепи гидрофобных и/или гидрофильных участков и т. д.).

Несмотря на впечатляющее разнообразие существующих методов и материалов (носителей), разработанных и применяемых для выделения, очистки и разделения смесей биополимеров, эти носители, как правило, нельзя отнести к универсальным (за исключением, пожалуй, способов, основанных на принципах гелефильтрации или концентрирования с применением полимерных сшитых набухающих гелей, т. е. в тех случаях, когда стараются в максимальной степени избежать специфического взаимодействия между подложкой и биомacroмолекулой). В большинстве же случаев для решения конкретной задачи по выделению/очистке того или иного биополимера используют специально разработанные сорбенты, стремясь обеспечить максимальную селективность разделения. При этом по возможности стараются учитывать свойства всех компонентов, содержащихся в исходном образце (пробе), а также условия отбора и подготовки пробы к анализу (выделению целевого компонента) с целью сохранения нативной конформации и функциональных свойств выделяемых макромолекул.

Перечисленные соображения позволяют обосновать необходимость в разработке многоцелевых носителей (сорбентов), модифицированных синтетическими полимерными фазами, совместимыми с различными биополимерами, т. е. не вызывающими при контакте с ними необратимой денатурации и одновременно обеспечивающими эффективное разделение компонентов смеси. В идеале такие полимерные фазы (или их сочетания) в определенном смысле должны «имитировать» основные свойства биомакромолекул, т. е. характеризоваться заданной и обратимо изменяющейся в соответствии с условиями разделения вторичной или даже третичной структурой, наличием системы гидрофобных и гидрофильных участков, специфических центров сорбции. Можно предположить, что сочетание указанных свойств обеспечит возможность эффективного разделения различных классов биополимеров с использованием одного материала, а также (при изменении условий разделения) успешно проводить более тонкие манипуляций с разделяемыми объектами, относящимися к одному классу соединений (например, проводить разделение одно- и двунитевых НК). Свойства полимерных модификаторов (прежде всего, фторсодержащих полимеров и полианилинов), предлагаемых для практического решения данных задач, а также особенности синтеза и практического применения полученных на их основе многоцелевых композиционных сорбентов, подробно обсуждаются в диссертации.

Научное направление, к которому относится проведенное исследование, можно сформулировать следующим образом: разработка научных принципов получения наноструктурированных полимерсодержащих систем для одностадийного выделения ДНК из биологических образцов и методологии их практического применения.

Практическая **цель диссертационной работы** состояла в разработке масштабируемых технологий синтеза поверхностно-модифицированных фторполимерами и полианилинами композиционных наноструктурированных сорбентов, демонстрирующих эффект *«негативной селекции»* в отношении НК, а также эффективных протоколов их применения для одностадийного выделения нуклеиновых кислот из биологических смесей, а также для разделения смесей белков и в качестве рабочих тел в биоаналитике и при синтезе фрагментов нуклеиновых кислот.

Для достижения указанной цели было 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 специально синтезированных полиарамидов с закономерно меняющейся структурой, содержащих набор структурных элементов (ароматический азот, фтор, а также донорные и акцепторные фрагменты), моделирующих свойства ФП и ПАНИ;

- разработать технологичные способы синтеза поверхностно наноструктурированных 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 методики (протоколы) пробоподготовки с применением полученных сорбентов с целью выделения НК и белков для молекулярной диагностики, основанные на «*негативной селекции*» в отношении НК;

- экспериментально 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 пробы (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.

В рамках исследования разработаны масштабируемые технологии синтеза поверхностно-модифицированных композиционных наноструктурированных сорбентов, демонстрирующих «негативную селекцию» в отношении НК, исследование физико-химических и сорбционных свойств полученных сорбентов, а также разработаны эффективные протоколы их применения для одностадийного выделения НК из биологических смесей и последующего разделения белковых смесей.

Объекты и методы исследования. В качестве носителей для синтеза сорбентов в работе использованы объемно-пористые пористые кремнеземы благодаря их жесткости, контролируемой пористости и развитой поверхности. Картриджи, содержащие слой дисперсного сорбента с развитой поверхностью, оптимальны для выделения ДНК из клинических проб, проб объектов ветеринарного надзора и

сельскохозяйственных проб. Выбор других носителей продиктован свойствами образца, из которого следовало выделять НК. Для выделения ДНК особо опасных патогенов наиболее эффективны мультикапиллярные полимермодифицированные наконечники (отсутствует этап центрифугирования, следовательно, снижается риск контаминации). Биосепарирующие элементы, содержащие кроме сорбента дополнительный слой удерживающего жидкость материала, использованы при работе с образцами с низким содержанием ДНК (при ПЦР-диагностике бактериальных возбудителей в водоемах, в воздухе). Мембранные сорбенты оказались эффективны при выделении ДНК из проб, содержащих наиболее распространенные бактериальные возбудители урогенитальных инфекций. Выбор носителя также зависел от назначения получаемого материала (при синтезе олигонуклеотидов использовали дисперсные носители; при масс-спектрометрии белковых анализов – полимермодифицированные кремниевые пластины).

В исследовании использовали различные полимерные модификаторы поверхности носителей. В частности, при получении сорбентов поверхность носителей модифицировали политетрафторэтиленом, сополимерами тетрафторэтилена (с гексафорпропиленом, аллиламином, аллиловым спиртом), полифторбутадиеном, полианилином, поликомплексами полианилина с полисульфоокислотами, сополимерами анилина с замещенными анилинами (3-аминбензойной кислотой, *o*-толуидином, *n*-нитроанилином), частично фторированными полиэфирами, а также серией специально синтезированных полиарамидов (любезно предоставленных проф. Др.-Дж. Ляо; Тайваньский университет).

Полимерные модификаторы синтезировали методами радикальной, радиационной прививочной или окислительной полимеризации, а также в результате полимераналогичных превращений предварительно полученных прекурсоров (обработка дифторидом ксенона, иммобилизация остатков нуклеозидов). Синтез сорбентов осуществляли в присутствии неактивированных носителей или носителей с активированной различными способами поверхностью (силамиинирование, иммобилизация полисульфоокислот, озонирование или гидрофобизация поверхности носителя), получая соответствующие композиционные сорбенты.

При исследовании физико-химических и сорбционных свойств разработанных материалов использовали ртутную порометрию, элементный анализ, РФЭС, ВЭЖХ, УФ- и ИК-спектроскопию, оптическую микроскопию, сканирующую зондовую микроскопию, электрофоретические методы, лазерную корреляционную

спектроскопию, спектрально-корреляционный метод, определение ξ -потенциала, рН-метрию, методы качественного и количественного химического анализа, ПЦР (в том числе, ПЦР в реальном времени), масс-спектрометрию, ЭПР.

В качестве биологических объектов и источников биополимеров в исследовании были использованы как модельные растворы НК, белков и их смеси, так и естественные источники биополимеров, такие как лизаты бактериальных культур, биологических жидкостей (кровь, сыворотка, плазма крови человека и животных, мокрота, урогенитальные мазки), мицелия грибов, тканей растений, пищевых продуктов, экстрактов почвы и др. для выделения биополимеров из вирусов, бактерий, простейших грибов, растений, тканей человека и животных.

Научная новизна исследования. Впервые обнаружен и исследован эффект низкой сорбционной активности ряда полимеров (фторсодержащие полимеры, полианилины, полиарамида) по отношению к НК (*«негативная селекция»*) при одновременной их высокой сорбционной активности по отношению к белкам и другим компонентам биологических смесей (*«позитивная селекция»*).

Впервые исследованы сорбционные свойства фторполимер-, ПАНИ- и полиарамид-модифицированных композиционных сорбентов в отношении ДНК, РНК и белков в режиме статической и динамической сорбции; установлены факторы, определяющие механизмы сорбции указанных биополимеров на поверхности полученных сорбентов.

На основе обнаруженного эффекта разработаны воспроизводимые и технологичные методы синтеза сорбентов, обеспечивающих одностадийное выделение НК из биологических смесей с возможностью последующего выделения компонентов белковой фракции.

Разработанные методы основаны на получении нанотолщинных фторполимер- и ПАНИ-покрытий как за счет модифицирования поверхностей инертных носителей, так и за счет предварительной активации поверхности носителей с целью локализации полимеризации мономеров на поверхности носителей различной природы (дисперсные кремнеземы, стеклянные мультикапилляры, синтетические мембраны, кремниевые пластины и др.). В частности, 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; разработаны способы полимеризации анилина на

гидрофобных поверхностях и на предварительно иммобилизованных на поверхности носителей полисульфокислот.

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

Впервые использовано свойство анилинсодержащих полимеров (сополимеров анилина с 3-аминобензойной кислотой) абсорбировать энергию лазера, облегчая ионизацию анализируемого вещества при масс-спектрометрии белков и пептидов в формате SELDI-TOF-MS (*лазерная десорбция/ионизация, усиленная поверхностью*) без добавления «*вещества-матрицы*» - абсорбера энергии. На основе указанного свойства и благодаря тому, что такие полимеры в различной степени удерживают белки (пептиды) в зависимости от значения их pI , разработана и запатентована эффективная система для масс-спектрометрии полипептидов.

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

Впервые разработан способ одновременного выделения четырех жиро- и пяти водорастворимых витаминов из крови человека, основанный на последовательном проведении жидкофазной экстракции и твердофазной экстракции с использованием кремнеземного сорбента, модифицированного фторсодержащим полимером, для последующего ВЭЖХ-анализа.

Практическая значимость работы. Запатентованы способы получения и применения ФП- и ПАНИ-модифицированных сорбентов для одностадийного выделения ДНК из различных источников (патенты США: US 2006/243658 A1, US 7018538 B2, US 2008/0015341A1; US 7772152 B2, патенты РФ № 2547597, № 2631934 С1). Разработаны воспроизводимые протоколы одностадийного выделения ДНК из различных источников (включая «сложные» образцы, такие как лизаты растительных тканей, кровь человека и животных), пригодных для непосредственного использования в ПЦР-анализе. 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). Разработанные протоколы одностадийного выделения ДНК возбудителей гепатита В, бактериальных и грибковых урогенитальных инфекций и туберкулеза человека и др. успешно апробированы в лабораторных условиях в НМИЦ Гематологии, ЗАО «НПФ Синтол» (г. Москва), ООО «НПФ Генлаб» (г. Москва), ООО «Амбер» (г. С.-Петербург), ФКУЗ «МИКРОБ», г. Саратов). Разработаны регламенты на опытное производство композиционного сорбента Si-500-ФП-ПАНИ и мембранного сорбента МФК-ПАНИ для одностадийного выделения ДНК из клинических проб. Разработан БЭ, содержащий ФП-модифицированный сорбент и концентрирующий слой полимерных гранул, применение которого обеспечило одностадийное выделение, очистку и концентрирование ДНК из лизатов бактериальных спор. Получен и успешно апробирован в лаборатории компании Prologo GmbH (Германия) композиционный носитель, модифицированный ФП, для твердофазного синтеза олигонуклеотидов. Разработан колоночный вариант ВЭЖХ-разделения белковых/пептидных смесей с использованием полученного ПАНИ-сорбента в рН-градиенте без добавления органического компонента в подвижную фазу. Запатентован способ модифицирования кремниевых пластин сополимерами анилина с замещенными анилинами и их использование в качестве рабочих тел для масс-спектрометрии в формате SELDI-MS без добавления *«вещества-матрицы»* (патент WO 2011004308 A1). Разработан способ одновременного выделения производных девяти витаминов (водо- и жирорастворимых) из одного образца крови человека с использованием кремнеземного сорбента с фторопластовым покрытием 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 полисульфо кислотами, 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.

Результаты работы использованы при выполнении ряда отечественных и международных грантов, а также договоров по выполнению НИР (НИОКР), в частности:

грантов РФФИ 97-03-32781-а «Структура и свойства гибкоцепных полимеров на границе раздела фаз»; грант РФФИ 98-03-32122-а «Поликонденсация поверхностно-активных мономеров в монослоях для создания полимерных организованных надмолекулярных структур»; 01-03-33115-а «Композиционные многокомпонентные полимерные системы с регулируемой функциональной активностью», 01-04-49253-а «Изучение специфичности сиалосвязывающих лектинов (сиглеков) и их участия в процессах углевод-белкового узнавания на клеточном уровне», 02-04-48819-а «Новые трехмерные системы для культивирования клеток животных»; 04-03-32465-а «Новые многокомпонентные рН-чувствительные системы с иммобилизованными ультра-тонкими полимерными фазами»;

гранта МНТЦ № 1233 (2003-2005 г.г.) «Разработка иммунофильтрационных и иммуноферментных экспресс-диагностических тест-систем для определения инфекционных заболеваний» (совместно с ИОФАН РАН);

ряда договоров на проведение НИР между ИБХ РАН и АНО «Центр биотической медицины» на проведение пробоподготовки для определения содержания биологически активных соединений (аминокислот, витаминов) в биологических образцах (2007–2009 г.г.);

соглашения о научно-техническом сотрудничестве между ИБХ РАН, ФГУ НИИ ФХМ Росздрава, НПП «Биотех-М» и ООО «Хабо» о проведении комплексного исследования морфологии и свойств перфторполимер-содержащих гемосорбентов (2006–2008 г.г.);

государственного контракта Министерства обороны РФ 2/01-07/ИБХ (шифр «Испарение-1-ИБХ») (2007–2008 г.г.) на проведение НИОКР по разработке биосепарирующего элемента для одностадийного выделения бактериальной ДНК из биологических проб;

договора № 55 между ИБХ РАН и ООО НПП «Наноструктурированная технология стекла» (г. Саратов) на проведение НИР по теме: «Разработка набора для выделения внеклеточной циркулирующей ДНК из плазмы крови человека с использованием модифицированных полимерами стеклянных мультикапиллярных наконечников» от 12 декабря 2013 г. (2013-2014 г.г.);

проекта 6-ой рамочной программы Евросоюза NACBO «Новые и усовершенствованные наноматериалы, химические методы и оборудование для нанобиотехнологии», NMP4-СТ-2004-500804 (2004–2009 г.г.);

проекта 6-ой рамочной программы Евросоюза DIAGNOSIS «Разработка новых и рентабельных методов неинвазивной диагностики патогенных микроорганизмов человека», LSHV-СТ-2006-037212 (2007–2010 г.г.).

Апробация работы. Результаты исследований и основные положения диссертации докладывались и обсуждались на российских и 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.), конференция «Фундаментальные проблемы науки о полимерах (к 90-летию академика В.А. Каргина)» (Москва, 1997 г.), конференция «Фармацевтическая биоэтика» (Москва, 1997 г.), IX, XVI, XX, XXII, XXVIII и XXIX Зимняя международная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва – 1997, 2004, 2005, 2008, 2016, 2017 гг.), ICT-Workshop Biotechnology (Wiesbaden, Germany, 1999 г.), 17th DECHEMA Annual Meeting on Biotechnology (Wiesbaden, Germany, 1999 г.), Второй всероссийский каргинский симпозиум (с международным участием) «Химия и физика полимеров в начале XXI века» (Черноголовка, 2000 г.), V, VI и VIII чтения, посвященные памяти академика Ю.А. Овчинникова «Биоорганика – 2000, -2002, -2006» (Москва, Пущино - 2000, 2002, 2006 гг.), Humboldtian Conference - Biomedical Science 2001 (Moscow, 2001 г.), Malaysian-Russian Seminar on Bioorganic Chemistry (Moscow, 2002 г.), III съезд биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002 г.), 22 International Symposium on the Separation of Proteins, Peptides and Polynucleotides (Heidelberg, Germany, 2002 г.), Международная конференция по физико-химической биологии, посвященная 70-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2004 г.), Международная научно-техническая конференция «Наука и образование – 2005» (Мурманск, 2005 г.), 1st and 2nd NACBO International Nanobiotechnology Conference (Urbino, Italy, 2006 г., Roma, Italy, 2009 г.), Четвертая, Пятая, Шестая и Седьмая Всероссийская Каргинская Конференция “Наука о полимерах 21-ому веку” (Москва – 2007, 2010, 2014, 2017 гг.), EPF-2007 (Portoroz, Slovenia, 2007 г.), XVIII менделеевский съезд по общей и прикладной химии - Химия материалов, наноструктуры и нанотехнологии (Москва, 2007 г.), DIAGNOSIS 2nd International Conference (Tel Aviv, Israel, 2008 г.), XVI

международная конференция и дискуссионный научный клуб «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии (IT + M&Eс' 2008)» (Ялта-Гурзуф, Украина, 2008 г.), III International Conference on Colloid Chemistry and Physicochemical Mechanics (Москва, 2008 г.), Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 75-летию со дня рождения академика Ю. А. Овчинникова (Москва – Пушкино, 2009 г.), ESBES + ISPPP + ISB Symposia - DECHEMA (Bologna, Italy, 2010 г.), Международный конкурс научных работ молодых ученых в области нанотехнологий, Международный форум по нанотехнологиям (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 московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2013 г.), Международная конференция, посвящённая 55-летию ИБХ РАН и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2014 г.), IV Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (Краснодар, 2014 г.), I Всероссийская конференция с международным участием «Химический анализ и медицина» (Москва, 2015 г.), VI бакеевская всероссийская с международным участием школа-конференция для молодых ученых «Макромолекулярные нанообъекты и полимерные нанокомпозиты» (Москва, 2016 г.), III Всероссийская конференция с международным участием «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (Краснодар, Россия, 2017 г.), BIT's 7-th Annual World Congress of Nano Science & Technology-2017 (Fukuoka, Japan, 2017 г.), Седьмая всероссийская каргинская конференция «Полимеры - 2017» (Москва, 2017 г.), XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва, 2019 г.).

Наборы для пробоподготовки бактериальной ДНК на основе разработанных композиционных сорбентов с методическими рекомендациями по их применению использовали в лабораторном студенческом практикуме, выполняемом на базе Учебно-научного центра ИБХ РАН. Наборы для одностадийной пробоподготовки ДНК на основе разработанных сорбентов переданы в организации биомедицинского профиля (НМИЦ Гематологии, ЗАО «НПФ Синтол», ООО «НПФ Генлаб», ООО «Амбер», ФКУЗ РосНИПЧИ Роспотребнадзора МИКРОБ), где была подтверждена

высокая эффективность их применения по сравнению со стандартными коммерческими методиками пробоподготовки, основанными на многостадийном механизме выделения НК, в частности, для одностадийного выделения ДНК возбудителей гепатита В, бактериальных и грибковых урогенитальных инфекций и туберкулеза человека.

Личный вклад автора. Автору принадлежит решающая роль на всех этапах работы - от выбора направления, постановки конкретных 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 100 работ, в том числе, 19 статей, 1 глава в монографии, 7 патентов, 66 тезисов докладов на российских и международных конференциях, более 10 официальных российских и международных отчетов, методические указания и 2 технологических регламента.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, 5-ти глав, выводов, библиографического списка (439 наименований) и изложена на 382 страницах, содержит 36 таблиц и 127 рисунков.

ГЛАВА 1. МЕТОДЫ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ; ПРИМЕНЯЕМЫЕ НОСИТЕЛИ, СОРБЕНТЫ И ПОЛИМЕРНЫЕ МОДИФИКАТОРЫ (обзор литературы)

Обзор научной литературы содержит несколько подразделов. В начале обзора рассмотрены основные методы, применяемые в практике клинических и исследовательских лабораторий для выделения НК и физико-химические процессы, лежащие в основе таких методов. В следующих подразделах рассмотрены различные типы носителей (матриц), которые либо уже широко применяются при получении композиционных сорбентов (кремнеземы, синтетические мембраны), либо представляются перспективными в этом качестве (стеклянные мультикапилляры). Отдельно рассмотрены основные физические и химические методы синтеза композиционных сорбентов, применяемых при разделении компонентов биологических смесей, в частности, смесей, содержащих биополимеры. В целом, обзор отражает хронологию развития методов синтеза таких материалов, а также позволяет обосновать выбор носителей и полимерных модификаторов, использованных в настоящем исследовании.

1.1. Методы подготовки образцов для выделения биополимеров из биологических смесей; основные способы выделения НК

Для эффективного выделения чистых препаратов НК или белков из многокомпонентных смесей (таких как биологические жидкости, лизаты тканей человека, животных, растений или грибов, фармацевтические смеси, пищевые продукты, экстракты почв, фильтраты воды или воздуха и т. д.) вначале необходимо обеспечить условия, позволяющие изолировать выделяемые макромолекулы из биологического субстрата. Важнее всего добиться разрушения клеточных мембран (или вирусных капсидов), а также разрушения нуклеопротеидных комплексов за счет солюбилизации макромолекул НК и белков в результате лизиса, затем очистить выделяемый биополимер от твердых и растворенных примесей и (если необходимо) сконцентрировать выделенный компонент для последующего анализа и использования.

Впервые ДНК выделил в 1869 г. Мишер из лейкоцитов гноя, который он собирал с хирургических повязок с целью исследования содержащихся в этих клетках белков. Из лейкоцитарных ядер Мишер выделил новое вещество, названное им

«нуклеином», и через два года опубликовал свое открытие [7]. Только спустя почти 90 лет была разработана первая рутинная процедура выделения ДНК в градиенте плотности CsCl из бактериального лизата *Escherichia coli*, полученного под действием додецилсульфата натрия [8]. К настоящему времени известно множество способов выделения биополимеров (в частности, НК) из разнообразных биологических источников, и ежегодно исследователи предлагают новые полезные модификации уже известных протоколов.

Тем не менее, как правило, методы выделения и очистки биополимеров из биологических образцов сводятся к использованию одного из трех физико-химических процессов (или их комбинации). Первая группа методов включает *экстракцию*, т. е. разделение/выделение компонентов смесей или суспензий (*биосепарацию*) благодаря избирательному растворению индивидуальных компонентов смеси в подходящих растворителях. При этом выделяемое вещество должно лучше растворяться в экстрагенте, нежели в исходной среде (или проявлять большее сродство к поверхности сорбента, чем к среде, при проведении твердофазной экстракции). В качестве примеров часто используемых методов, основанных на экстракции, можно привести фенол-хлороформную экстракцию геномной ДНК или мРНК [9,] и щелочную экстракцию плазмидной ДНК с использованием стеклянных порошков [10]. Для выделения НК (в частности, мРНК) из клеток и тканей используют экстракцию из образцов смесью фенол-гуанидинтиоцианат–хлороформ [11] и т. д. К недостаткам перечисленных методов следует отнести длительность выделения (не менее 3.5 ч), многостадийность процесса, необходимость применения токсичных органических растворителей и низкий выход продукта (не более 50% - для ДНК, около 7% - для РНК).

В отдельную подгруппу жидкостных методов можно выделить способы разделения биополимеров (НК и белков), клеток, мембран, клеточных органелл, и микроорганизмов в смеси несмешивающихся водных растворов полимеров (т. е. в двухфазной водной системе), например в смеси 5% раствора декстрана и 3.5% полиэтиленгликоля [12].

Еще одна группа методов биосепарации включает различные способы *осаждения* целевого компонента. Такие способы основаны либо на физическом осаждении за счет преципитации, центрифугирования, нагревания, охлаждения, концентрирования или разбавления, что приводит к изменению агрегатного состояния компонентов смеси (раствора), либо на селективной химической сорбции за счет химического или кулоновского взаимодействия молекул сорбата с функциональными

группам на поверхности сорбента. Соответствующие примеры включают осаждение ДНК или белков ультрацентрифугированием [13, 143], препаративное ультрацентрифугирование ДНК в градиенте плотности хлорида цезия [9, 15], пересаживание белков в спиртах [9, 16-18], осаждение белков ацетатом аммония или сульфированным декстраном [19], осаждение олигонуклеотидов и ДНК спиртами при пониженной температуре [9], высаливание [9, 19], различные варианты аффинной хроматографии белков [19] и др.

В качестве частного случая экстракции допустимо рассматривать твердофазную экстракцию (которую одновременно можно отнести к *адсорбционным процессам*). Следует учитывать, что при твердофазной экстракции (ТФЭ) концентрирование целевого компонента происходит на поверхности специального сорбента, т. е. на границе раздела сорбент/жидкая среда. К этой группе методов относятся, например, очистка НК адсорбцией на поверхности пористых кремнезёмов [9, 20], различные способы очистки НК и белков на магнитных частицах [21, 22].

Нередко протоколы проведения ТФЭ методически очень похожи на протоколы проведения жидкостной колоночной хроматографии, когда экстракция определенных компонентов происходит за счет их удерживания при взаимодействии с поверхностью сорбентов, упакованных в короткие колонки (картриджи), изготовленные из стекла, полиэтилена, полипропилена или фторопласта. При проведении ТФЭ необходимо сконцентрировать отдельные вещества или группы сходных по свойствам веществ. Концентрирование происходит в соответствии с растворимостью выделяемых соединений, в зависимости от их ионообменных или комплексообразующих свойств и т. д. Важно, чтобы целевой компонент (или компоненты) отличался наибольшим (или наименьшим) фактором удерживания, чтобы все остальные компоненты элюировались ранее (или наоборот, позднее) [23].

Чаще всего при проведении ТФЭ используют «нативные» (т. е. немодифицированные) кремнезёмы, химически модифицированные кремнезёмы (ХМК), синтетические полимерные мембраны или композиты, содержащие указанные компоненты. ТФЭ применяют для концентрирования органических соединений из морской и пресной воды и из почв, для извлечения биологически активных веществ из сыворотки и плазмы крови, мочи, желчи и экстрактов различных тканей, для подготовки проб продовольственного сырья, пищевых продуктов и кормов. ТФЭ эффективна в медико-фармацевтических исследованиях при концентрировании, очистке и количественном определении стероидов, пептидов, некоторых витаминов, нуклеотидов, ряда лекарственных препаратов и метаболитов [24], при определении

нормируемых токсикантов (например, микотоксинов) в пищевой промышленности [25]. К середине 90-х годов прошлого века было известно около 400 методик подготовки проб с помощью ТФЭ, а в настоящее время их уже несколько тысяч. Методы с использованием ХМК обеспечивают возможность десорбции биологически активных веществ с сорбента для дальнейшего анализа. Другие типы сорбентов (например, активированный уголь) также способны адсорбировать большое число природных соединений, однако последние чаще всего удерживаются необратимо.

Наконец, в многочисленную группу *хроматографических методов* объединены способы разделения смесей веществ или частиц, основанные на различиях в скоростях их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся друг относительно друга фаз. Различные варианты хроматографии широко применяются при разделении смесей белков и/или НК [26]. Как правило, при хроматографическом разделении в различной степени реализуются механизмы взаимодействия растворенных и/или адсорбируемых молекул, которые имеют место при экстракции, осаждении и адсорбции (за исключением, пожалуй, методов, основанных на гель-фильтрации, при которой сорбционную активность сорбента стремятся свести к минимуму). Примеры применения композиционных полимерсодержащих материалов (а также ХМК) будут рассмотрены ниже.

Поскольку в большинстве методик с использованием сорбентов вначале требуется высвободить выделяемый биополимер, входящий в состав пробы (т. е. провести лизис образца), уместно в общих чертах рассмотреть основные подходы, применяемые для этого на практике.

С целью извлечения НК из клеточных органелл (ядро, митохондрии, пластиды) клетки могут быть физически разрушены различными методами, такими как, например, метод замораживания-оттаивания [27], метод суспензионной гомогенизации [28], метод обработки ультразвуком [29, 30], метод растирания в жидком азоте [31] и их комбинации. Чаще всего применяют первые два упомянутых метода.

Химические методы лизиса основаны на использовании различных солибилизирующих и дестабилизирующих агентов, таких как ионогенные и неионогенные поверхностно-активные вещества (например, додецилсульфат натрия [9, 32], тритон X-100, твины, лаурилсаркозин [9, 33] и др.), хаотропные агенты (гидрохлорид гуанидинтиоцианата и перхлорат натрия) [9, 20, 33]. Нередко химический лизис включает стадию высокотемпературной инкубации (при 60°C и более) [9]. Очень часто процедуры лизиса основаны на разрушении клеточных стенок

и мембран благодаря использованию ферментов, таких как лизоцим, субтилизин, лизостафин, протеиназа К [9, 34]. Иногда применяют метод химической флокуляции, в частности, для извлечения ДНК из почвы [35].

При пробоподготовке образцов, содержащих бактериальные клетки и/или вирусные частицы, наилучшие результаты достигаются в процессе разрушения клеточной стенки бактерий или вирусного капсида благодаря проведению комбинированного химического и энзиматического лизиса (иногда к этому добавляют термическую обработку). В компактных устройствах (таких, например, как спин-колонки) при работе с малыми объемами образца (десятки или сотни мкл) с помощью фильтрации через специальную мембрану удается быстро выделять клетки (вирусы) для их последующего лизиса. Сконцентрированные таким способом клетки можно лизировать непосредственно на мембране. Для фильтрации образца можно использовать фильтры из боросиликатного волокна, целлюлозные мембраны, ПТФЭ-фильтры, мембраны из поливинилиденфторида [36]. Последние, как правило, предпочтительны, т. к. фильтры из боросиликатного стекловолокна после окончания фильтрации часто содержат остаточное количество воды (или рабочего раствора), кроме того, они могут выделять вещества, ингибирующие полимеразу. Мембраны на основе целлюлозы отличаются хрупкостью и также могут выделять вещества-ингибиторы ПЦР. Эффективность гидрофобных ПТФЭ-мембран сильно снижается при фильтрации водных растворов.

В качестве сорбента чаще всего используют полимерные синтетические волокнистые мембраны или композиты на основе мембраны, содержащей встроенные частицы объемно-пористого кремнезема. После фильтрации эти мембраны, покрытые слоем клеток и/или вирусных частиц, обрабатываются раствором фермента для разрушения клеточных мембран (или капсидов в случае вирусов), затем лизирующим буферным раствором, содержащим хаотропный агент и детергент. Хаотропный агент используют для солюбилизации белков и удаления клеточного дебриса. Применение хаотропных агентов позволяет исключить стадию экстракции НК фенольно-хлороформной смесью и адаптировать метод к автоматическим процедурам выделения, например, к формату микрофлюидного модуля (подробнее устройство и использование микрофлюидных устройств обсуждаются ниже). Лизис клеток с последующей твердофазной сорбцией-десорбцией позволяет добиться эквивалентного или даже более высокого выхода НК по сравнению со стандартной методикой, основанной на экстракции фенол-хлороформной смесью с последующим переосаждением этанолом.

Широко используемые на практике методы лизиса клеток и вирусных частиц имеют серьезный общий недостаток, поскольку в результате таких процедур, как правило, получают лизат, содержащий наряду с целевыми НК, множество компонентов, способных ингибировать ПЦР. Иногда перед проведением лизиса и последующей ТФЭ выделяемой ДНК (РНК) целесообразно предварительно сконцентрировать клетки или вирусы из объема биологических образцов. Для этого используют фильтрацию образца [37], электрокинетическую фокусировку [38], аффинную хроматографию [39, 40] или микродиализ [41].

Классический способ выделения ДНК, например, из клинических образцов основан на использовании «немодифицированных» кремнеземов (силикагелей и макропористых стекол) [9, 20]. Принцип «позитивной селекции», лежащий в основе этого типа разделения компонентов, содержащихся в образце, базируется на специфическом взаимодействии ДНК с поверхностью кремнезема. ДНК адсорбируется на поверхности частиц кремнезема в присутствии хаотропной соли (гуанидинтиоцианата), взятой в высокой концентрации, при щелочных значениях рН. Вслед за этим проводят отмывку системы от несвязавшихся компонентов (примесей) и затем элюируют ДНК. Такой механизм выделения ДНК наглядно проиллюстрирован в работе Бруса с сотр. [20]. В физиологических условиях поверхность кремнезема имеет $pI \sim 2$, а это значит, что кремнеземная поверхность представлена, в основном, группами $Si-O^-$, а не $Si-OH$ [42]. При физиологическом значении рН в условиях очень высокой концентрации хаотропной соли присутствующие в растворе катионы могут образовывать более или менее стабильный слой противоионов на отрицательно заряженной поверхности кремнезема. В результате заряд поверхности кремнезема из отрицательного становится положительным. Почти все биомолекулы в водных растворах при физиологическом значении рН заряжены. Присутствие хаотропной соли вызывает денатурацию большинства биомолекул из-за разрушения их гидратных оболочек, что часто приводит к выпадению биомолекул в осадок. Исключением являются молекулы ДНК, которые устойчивы к денатурации и при физиологическом значении рН характеризуются наиболее высокими плотностями отрицательного заряда по сравнению с любыми другими биомолекулами (эффективная плотность заряда составляет один отрицательный заряд на 0.17 нм) [43-45]. Фосфатные группы ДНК в водной среде при физиологическом рН в основном депротонированы. Поэтому в хаотропных условиях молекулы НК весьма эффективно связываются с положительно заряженной поверхностью кремнезема, вытесняя другие молекулы с поверхности

кремнезема и оставляя их в растворенном состоянии. Затем образовавшийся комплекс «ДНК-кремнезем» отмывают солевым раствором или водно-спиртовой смесью от не связавшихся примесей, после чего очищенную ДНК можно элюировать с сорбента буферным раствором с низким содержанием солей или водой [46] (Рисунок 1.1.).

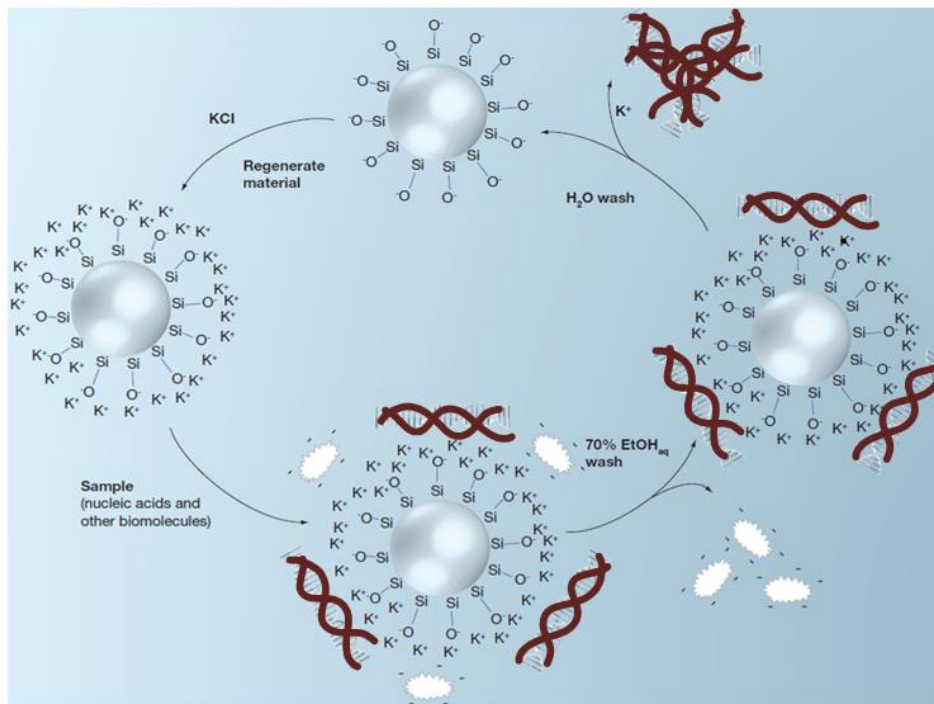


Рисунок 1.1 - Механизм выделения ДНК на немодифицированных кремнеземах [20].

Такой многостадийный механизм выделения НК, основанный на сорбции-десорбции, широко применяется на практике. Однако немодифицированные кремнеземы характеризуются низкой емкостью (0.5 мкг ДНК/1 мг кремнезема), а при их использовании удается выделять ДНК только длиной более 40000 п. о. Таким образом, элюируется не более 50% всей ДНК, так как 50-60% низкомолекулярной ДНК адсорбируется на поверхности кремнезема необратимо. Это означает, что выход ДНК составляет всего 40-50% [47]. В этом отношении интересна работа [48], в которой исследовали влияние температуры на выход ДНК микобактерий туберкулезного комплекса при ее выделении с помощью кремнеземсодержащих микроколонок из модельных растворов в интервале температур 20-90°C. Авторы показали, что выход ДНК линейно возрастает при повышении температуры вплоть до 70°C, а затем несколько снижается при более высоких температурах. Так, максимальный выход при 70°C составил 73% (на 50% выше, чем при 20°C). По

мнению авторов, описанный эффект связан с изменением вязкости растворов ДНК при росте температуры.

Несмотря на существенные потери при выделении ДНК с помощью немодифицированных («нативных») кремнеземов, последние широко используются в пробоподготовке в самых разнообразных вариантах. Так, например, выделение НК в результате адсорбции на поверхности кремнеземов проводят с помощью материалов, поверхностно модифицированных слоями диоксида кремния, в миниатюризованном и автоматизированном формате, например, с использованием микроканалов в составе особых устройств, т. н. «*lab-on-a-chip*» (или «*лаборатории на чипе*»), биосенсоров, а также с помощью гибридных наночастиц [49, 50]. В последнем случае биосепарацию ДНК (РНК) проводят на поверхности наногибридных частиц с намагничиваемой сердцевинкой, покрытой кремнеземной оболочкой [51]. Отличие этого метода от описанных ранее состоит в том, что частицы не упакованы в микроколону, а используются в виде суспензии (т. е. осуществляется «batch-процесс» [52]. Использование кремнеземных или кремнеземсодержащих частиц облегчает работу с вязкими и неоднородными образцами, что сокращает продолжительность процедуры выделения НК и делает возможным ее автоматизацию [53, 54]. В качестве примеров успешного применения кремнеземных матриц можно привести описанные в литературе способы выделения высокомолекулярной ДНК из почвы [55] и фитопланктона [56].

При выделении НК из лизатов клеток микроорганизмов и/или вирусных частиц иногда на этапе очистки и/или концентрирования применяют гель-фильтрацию с помощью сшитых смол на основе агарозы (сефароза) или декстрана (сефадекс) [57] или ионообменные сорбенты [58]. Все же, наибольшее распространение получила твердофазная экстракция НК, поскольку принцип «положительной селекции», положенный в основу этого метода (последовательное осуществление удерживания выделяемого компонента смеси, отмывка его от примесей и последующая элюция) легко адаптировать в формат микрофлюидной системы. Как уже отмечалось, для проведения ТФЭ НК помимо «нативных» кремнеземов используют магнитные частицы, покрытые кремнеземом, а также стекловолоконистые фильтры, химически модифицированные кремнеземы, синтетические и композитные мембраны. Следующие примеры иллюстрируют многообразие разработанных систем – от простейших (с использованием спин-колонок или суспензий частиц кремнезема) - до полностью автоматизированных.

В компании Qiagen GmbH (Германия) разработана процедура последовательного выделения ДНК и РНК из одного и того же образца [59]. Образец обрабатывали хаотропным агентом, затем НК осаждали спиртом в присутствии частиц носителя, поверхность которого в указанных условиях способна связывать НК (в частности, кремнезем, магнитные частицы, содержащие на поверхности карбоксильные группы и др.). Затем ДНК и РНК последовательно элюировали с поверхности частиц, изменяя время контакта образца с поверхностью носителя. Эта процедура основана на различиях в кинетике сорбции ДНК и РНК (ДНК связывается значительно быстрее, чем РНК). Поэтому при малых временах контакта образца с носителем (5 – 60 с) элюировались образцы, обогащенные ДНК, а при увеличении времени контакта в 10-20 раз – образцы, обогащенные РНК. Отсюда следует, что для получения препаратов ДНК, очищенных от РНК, по окончании процедуры выделения требуется дополнительная очистка (либо добавление РНКазы к образцу), и наоборот, для получения чистых препаратов РНК - требуется дополнительная очистка от ДНК.

Известные методики выделения НК, основанные на «позитивной селекции», как правило, включают ряд последовательно проводимых вручную процедур, осуществляемых при подготовке и нанесении образцов на носитель, при замене картриджей (спин-колонок) и других расходных элементов, при отборе получаемых препаратов. Этапу элюции НК предшествует лизис клеток, за которым следует адсорбция НК, отмывка от растворенных примесей и нерастворимых частиц. Сопутствующие манипуляции сопровождаются термостатированием и/или центрифугированием, что увеличивает время, затрачиваемое на осуществление процедуры выделения, и ее себестоимость. В итоге, по мере роста числа этапов выделения повышается риск контаминации получаемых препаратов, а выход НК снижается (в первую очередь вследствие неспецифического необратимого удерживания определенного количества макромолекул на поверхности носителя, а также из-за возможных ошибок лаборанта). Очевидна необходимость в решении проблемы повышения выхода очищенных препаратов НК. Отчасти эта проблема решается благодаря использованию автоматизированных устройств (детальное описание которых дано в приведенных ниже ссылках).

С целью обнаружения вирусов гепатитов В, С и ВИЧ в сыворотке и плазме крови компания Roche Diagnostics (США/Швейцария) разработала систему COBAS AmpliPrep, обеспечивающую автоматическое выделение ДНК (РНК) с помощью магнитных частиц последующий ПЦР-анализ проб в реальном времени. Для устранения контаминации в системе предусмотрена периодическая обработка

образцов раствором, содержащим урацил-N-гликозилазу (фермент, селективно разрушающий ранее синтезированные ампликоны) [60].

Компания Qiagen GmbH (Германия) предлагает устройство QIA Symphony SP для одновременного автоматического выделения вирусной или геномной НК из 96 образцов крови. В этом устройстве используются колонки с магнитными частицами, покрытыми никель-нитрилотриацетатной агарозой (Ni-NTA) [61]. Эта же компания разработала автоматизированную станцию BioRobot MDx, содержащую 8 колонок со сменными фильтрами, для выделения геномной ДНК из крови или вирусной НК из сыворотки и плазмы крови. Ввод образца и его перемещение по каналам системы осуществляется с помощью вакуумного насоса [62].

В автоматизированном устройстве Thermo Scientific KingFisher, разработанном в компании Thermo Scientific (США), с помощью магнитных частиц осуществляется одновременное выделение ДНК, РНК и белков из 24 образцов биологических жидкостей (кровь, плазма, моча, слюна) объемом 20-200 мкл [63]. В компании Corbett Technologies (Австралия) разработали настольную роботизированную станцию Xtractor GeneTM System для выделения НК (из образцов объемом до 200 мкл), воспроизводящую ручное выделение НК [64].

Интересное решение, позволяющее снизить риск контаминации, реализовано в роботизированной системе компании Isis Pharmaceuticals, Inc., США (с 2015 г. – Ionis Pharmaceuticals, Inc.) для идентификации опасных инфекций [65]. Система включает два блока, разделенные воздушным шлюзом. В первом блоке происходит выделение и очистка ДНК, а во втором – ПЦР-диагностика. В выделительном блоке поддерживается давление выше атмосферного, в ПЦР-блоке – давление ниже атмосферного.

Сложность конструкции автоматизированных устройств по подготовке клинических образцов, как правило, определяет их громоздкость, высокую стоимость как самого оборудования (более 70 тыс. долл. США), так и компонентов для проведения анализов. В этих устройствах с помощью роботов воспроизводятся обычные ручные манипуляции, а сами устройства являются закрытыми системами, не предусматривающими вмешательство оператора в ход процесса. В большинстве случаев компании-производители стараются создать условия, при которых применение этих систем возможно лишь при использовании реагентов, предлагаемых компанией, разработавшей систему, и предназначенных для конкретной модели прибора.

Ряд компаний предлагает более простые, дешевые и относительно небольшие устройства, используя которые, оператор может заменять или модифицировать их компоненты и регулировать процесс выделения НК в соответствии с особенностями исследуемого образца. Процесс выделения НК в таких устройствах частично автоматизирован. Так, компания Millipore Corporation (США) запатентовала устройство для выделения НК из клеток, вирусов и микоплазм, основным элементом которого является система пористых фильтров (на основе полисахаридного волокна, полиэфирсульфона или стекловолокна), через которые последовательно пропускают образец [66]. На первом фильтре (мембране) клетки подвергаются лизису. Полученный лизат очищают, пропуская его через следующий фильтр, и вслед за этим элюируют очищенную НК. Элементы устройства, содержащие фильтрующие мембраны, соединены линией каналов, снабженной клапанами, а само устройство пригодно для одноразового и многоразового использования. Для одновременной обработки нескольких образцов фильтрующие элементы можно объединять в кассету. При использовании описанного устройства осуществляется ручной ввод реагентов и требуется неоднократно проводить центрифугирование.

В компании Valantis, Inc. (США) разработан способ выделения и очистки плазмидной ДНК в результате пропускания образца через систему статических смесителей (перемешивание происходит без участия подвижных механических устройств), в которых происходит лизис клеток, осаждение клеточного дебриса и выделение ДНК из лизата. В качестве необходимых процедур предусмотрены стадии центрифугирования и финальная очистка ДНК на ионообменной колонке [67]. К недостаткам этого способа (так же, как и предыдущего) следует отнести потребность в использовании центрифуги, а также необходимость дополнительной очистки полученного препарата плазмиды на ионообменной колонке.

Компанией Inivitrogen Corporation (США) запатентовано устройство (картридж) для выделения НК [68], включающее фильтрующий элемент и колонку для очистки НК. Фильтрующий элемент содержит несколько слоев фильтров, а колонка содержит носитель, способный связывать НК при определенных значениях рН среды и десорбировать НК при более высоких значениях рН. Манипуляции с образцом можно проводить с помощью шприца или насоса. Перед нанесением образца на картридж (что принципиально отличает это устройство от автоматизированных систем) необходимо предварительно обрабатывать образец (проводить лизис клеток, разбавлять образец и т. д.).

В последние годы для обработки биологических образцов и выделения НК все чаще используют устройства (разного уровня сложности) на основе микрофлюидных (микрожидкостных) систем. Такие устройства, как правило, содержат сеть микроканалов диаметром до 100 мкм, через которые пропускают малые объемы образцов и растворов реагентов.

В этих системах предусмотрены специальные резервуары, в которых проводится лизис, разделение компонентов биологической смеси, очистка, концентрирование и другие процедуры, а также перемешивающие устройства, микронасосы, микродозаторы, фильтры и др. Выделение и очистку НК можно осуществлять в полностью автоматическом режиме внутри модуля, изолирующего образец от внешней среды, либо в полуавтоматическом режиме (когда ввод образца и реагентов осуществляется оператором вручную). Различные типы микрофлюидных устройств для выделения НК и принципы их устройства рассмотрены, например, в обзоре [69]. В настоящее время можно говорить о том, что появление таких систем для выделения НК практически подтвердило эффективность перехода от жидкостно-жидкостной экстракции к твердофазной экстракции, методы которой относительно легко реализуются в микрочипах, в частности, с использованием покрытий на основе диоксида кремния, кремниевых элементов и др. [70, 71].

Впервые такое микрофлюидное устройство было описано в 1999 г. [72]. В составе этого микроустройства на внутренней поверхности извилистого (с целью максимального увеличения длины на ограниченной площади чипа) канала, предназначенного для ввода и пробоподготовки образца, были размещены микроскопические кварцевые столбики, имеющие площадь поверхности 3.5 нм^2 . Это обеспечило 10-кратное увеличение поверхностной емкости канала в отношении молекул ДНК по сравнению с гладким каналом. В похожих работах [73, 74] в каналах разработанных авторами устройств также имелись столбики, покрытые слоем диоксида кремния, увеличивающие площадь поверхности не менее чем в 6 раз (Рисунок 1.2, а). Тем не менее, в описанных случаях не удавалось выделить очищенную ДНК с высоким выходом. Кроме того, требовался относительно большой объем вводимой пробы (до 250 мкл) и высокое давление для продвижения пробы внутрь устройства, что затруднило интегрирование разработанных чипов с устройствами, основанными на других известных микрофлюидных процессах, в которых предусмотрено использование меньших объемов жидкости. В обзоре [71] также представлено устройство кремниевого чипа, в состав которого включена микроемкость эллиптической формы с плоским дном, на котором были размещены

кремниевые столбики с квадратным сечением, боковые поверхности которых имели по 5 вертикальных выемок каждая (по три глубоких и по две менее глубоких) с целью увеличения площади контакта с молекулами ДНК (Рисунок 1.2, б).

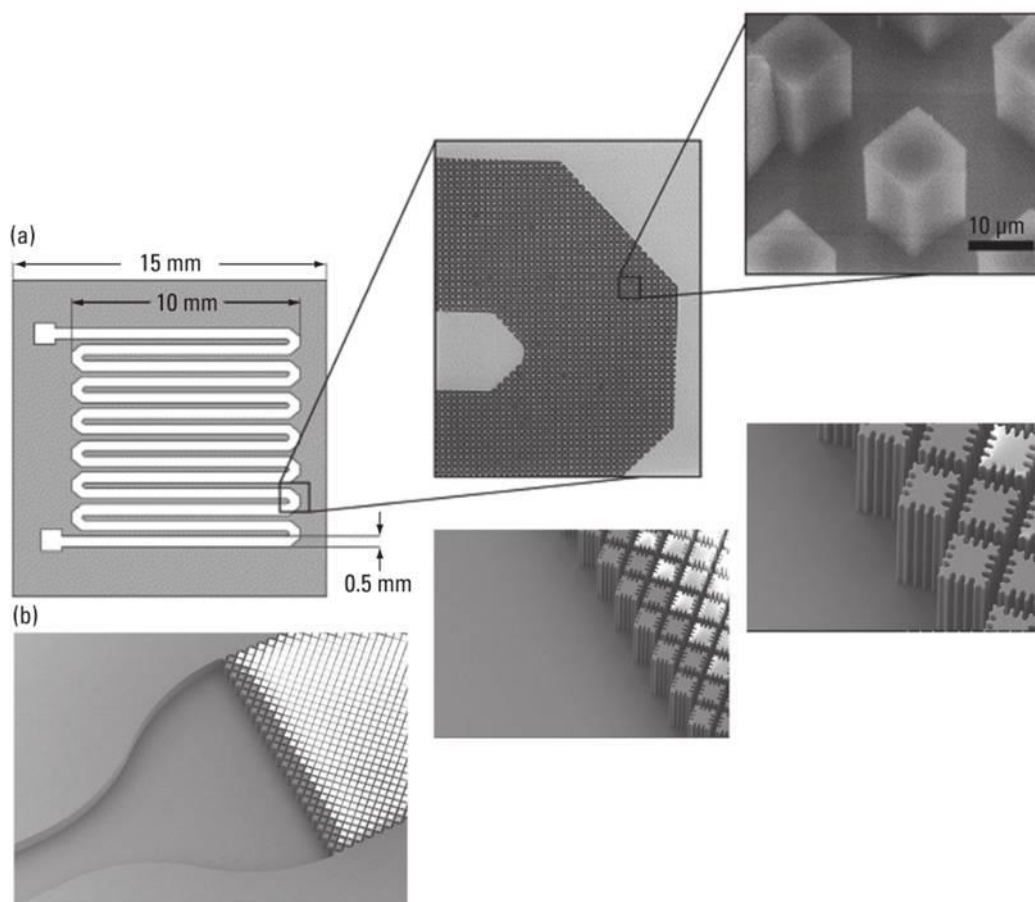


Рисунок 1.2 - (а) РЭМ-изображение кварцевых столбиков. Ширина колонны и расстояние между колоннами - 10 мкм. Глубина каналов и высота столбиков может варьироваться в диапазоне 20-50 мкм. (б) РЭМ-изображение микроструктуры кремниевого чипа, полученного с использованием технологии LIGA. Длина канала - 1 см, ширина - 800 мкм, глубина - 50 мкм; Общая площадь поверхности – 1.29 см². Ширина выемок на поверхности столбиков - 2 мкм, расстояние между ними - 4 мкм [71].

В этом случае речь идет об использовании т. н. LIGA-технологий (т. е. методов получения элементов изделия, основанных на использовании литографии, гальваностегии и формования литьем), позволяющих заменить стеклянные, кремниевые или кварцевые элементы на элементы, изготовленные из подходящих полимеров, что представляется весьма перспективным направлением при разработке новых микрофлюидных устройств.

В 2000 г. была опубликована работа [75], в которой для выделения ДНК из лейкоцитов использовались микроколонки, содержащие нанogramмовые количества

кремнеземных частиц размером 30-40 мкм. Позже эта методика была воспроизведена в микрочиповом формате [76]. Микроканалы в устройстве заполняли кремнеземными частицами, либо создавали непрерывную кремнеземную сетку с помощью золь-гель технологии, либо комбинировали эти подходы. для очистки ДНК. Процедура выделения ДНК с помощью разработанного чипа включала три этапа: адсорбцию ДНК в присутствии хаотропной соли, удаление примесей водно-спиртовой смесью и элюирование адсорбированной ДНК в небольшом объеме буфера, подходящего для проведения ПЦР. Этот метод позволил успешно экстрагировать и элюировать нанограммовые количества ДНК менее чем за 25 мин. Выделенная ДНК была пригодна для амплификации с помощью ПЦР. Золь-гель фазы в сочетании с кремнеземными частицами использовались для выделения ДНК и другими исследователями. Так, в работах [77, 78] было показано, что с помощью «гибридных» микрочипов, содержащих кремнеземные частицы, иммобилизованные в сетке геля, удается выделить ДНК из различных биологических источников, включая бактериальные лизаты, цельную кровь и сперму. Как утверждается в работе [76], эффективность экстракции ДНК на «гибридных» носителях в составе микрочипов может существенно снижаться из-за возникновения трещин в геле. Поэтому были предприняты попытки усовершенствовать структуру геля в результате использования полиэтиленгликоля в качестве порообразующего агента [79], что позволило стабилизировать пористую структуру наполнителя микроканалов в чипе и оптимизировать гидродинамику при пропускании жидкой пробы образца через систему.

Нельзя не упомянуть альтернативное решение, описанное в работе [80], в котором обеспечена периодическая смена направления потока образца (и рабочих буферных растворов) над иммобилизованным кремнеземным покрытием в объеме канала. Это решение по своей сути аналогично известной разработке «ZipTips» компании Millipore (США), в которой слой частиц гидрофобизованного кремнезема иммобилизован в кончике наконечника для ручной или автоматической пипетки [81].

С конца 80-х годов прошлого века независимо в России, США и Японии создавался задел для создания нового поколения устройств, основанных на использовании полимерных монолитов в качестве альтернативы материалам, используемым в колоночной ВЭЖХ. Так, в работе [82] предлагалось в качестве такой замены использовать жесткие пористые органические монолиты, размер пор которых контролируемо варьировался от нано- до микроразмеров, причем поры образовывали непрерывную сеть каналов с высокой площадью поверхности. В объеме небольшой

колонки (30 x 8 мм) проводили сополимеризацию глицидилметакрилата и этилендиметакрилата в среде растворителей-порогенов (смесь циклогексанола и додеканола) в присутствии азобисизобутиронитрила. Затем поверхностные эпоксигруппы полученного материала гидролизovali с целью получения диольных функций или аминировали. Полученные в результате мини-колонки с успехом применяли в качестве аналогов классических ВЭЖХ-колонок в различных вариантах хроматографии. В похожих работах (например, в [83]) авторы докладывали о получении фотополимеризуемых полимерных монолитов в результате полимеризации 3-метакрилоксипропилтриметоксисилана в присутствии кислотного катализатора, порогена и фотоинициатора. Полученный монолитный сорбент оказался эффективным при разделении смеси двух кумариновых красителей. Не упоминая здесь целый ряд других подобных работ, следует отметить, что осознание очевидных преимуществ использования монолитных материалов (контролируемая пористость и возможность реализации интенсивного массопереноса) спустя относительно короткое время привело к созданию устройства на основе полимерных монолитов для очистки ДНК в капиллярном формате [84]. В этой работе полимерный монолит формировали непосредственно в капиллярах в результате полимеризации 3-(метилоксисилил)пропилметакрилата с последующей прививкой на поверхность полученного монолита тетраметилортосиликата, что чрезвычайно повысило количество участков, связывающих молекулы ДНК. Объем вводимой пробы цельной человеческой крови с целью экстракции из нее ДНК был ограничен 100 нл в виду высокой сорбционной активности поверхности материала в отношении белков крови, конкурирующих за сайты связывания с молекулами ДНК. Для решения этой проблемы теми же исследователями было предложено микрофлюидное устройство для двухстадийной очистки ДНК [85]. При пропускании образца крови через это устройство сначала до 70% белков удерживалось на микроколонке, содержащей сорбент с фазой C18, а затем на монолите происходила доочистка ДНК. В результате эффективность очистки ДНК повышалась на 2 порядка.

В работах [86] описано микроустройство для выделения ДНК, содержащее полимерный монолит с импрегнированными частицами кремнезема. В этом устройстве поверхность монолита не участвовала в связывании ДНК, а само устройство оказалось непригодным для многократного применения из-за низкой стабильности системы монолит-кремнезем.

В [87] докладывалось о разработке полимерных монолитных дисковых сорбентов на основе макропористого полиглицидилметакрилата, сшитого

этилендиметакрилатом (ГМА-ЭДМА) с различными функциональными поверхностными группами. Эти материалы, демонстрирующие эффект «позитивной селекции» в отношении определяемых соединений, применяли для разделения смесей белков, в иммуноферментном анализе, в качестве ферментного реактора и др. Позже список сополимеров, пригодных для получения монолитных сорбентов, был расширен (в частности, использовали сополимеры глицидилметакрилата, 2-цианоэтилметакрилата и 2-гидроксиэтилметакрилата, сшитые глицерин-1,3-диметакрилатом) [88, 89]. Монолитные диски применяли в составе специальных «мембранных колонок», а стеклянные пластины, на поверхности которых были сформированы монолитные слои указанных сополимеров, использовали в качестве чипов для определения нанокolicеств биополимеров.

В контексте настоящего обзора необходимо упомянуть важные работы, в которых предпринята попытка исключить обработку биологического образца хаотропным агентом и отмывку органическими растворителями при выделении НК. Так, японскими исследователями в [90] предложено силаминировать поверхность каналов кремнеземного чипа с целью получения ионообменной фазы для обратимого рН-зависимого связывания НК, в частности, при выделении ДНК из крови. ДНК удерживалась при рН 6.0 и после отмывки от примесей элюировалась при рН 7.5 и выше. В другом исследовании на поверхность кварцевых микростолбиков в составе микрофлюидного устройства наносили слой оксида алюминия с целью электростатического удерживания молекул НК в кислых условиях с последующей их элюцией в щелочных условиях [91]. В работе [92] также предложена рН-чувствительная система для выделения ДНК из крови, основанная на использовании каналов или частиц, покрытых слоем хитозана, на котором молекулы ДНК удерживаются при рН 5.0 и элюируются при рН 9.0.

В качестве альтернативы кремниевым (и кремнеземным) субстратам были предложены микрофлюидные системы на основе фотоактивируемых поликарбонатов, на поверхности которых в результате УФ-обработки образуются функциональные группы, удерживающие НК при использовании специального связывающего буферного раствора [93]. Такие материалы были использованы при создании 96-луночного микрофлюидного чипа для выделения бактериальной ДНК. Однако неравномерность потока элюента при промывке системы приводила к получению неодинаковых результатов в разных лунках [94].

Прототипом мембранного микрофлюидного устройства служит способ получения сэндвичевой системы на основе пористой мембраны из оксида алюминия,

помещенной между двумя слоями полидиметилсилоксана, в каждом из которых предварительно создана сеть микроканалов [95]. Это устройство использовали для удерживания ДНК фага λ .

Заслуживают также внимания исследования, посвященные разработке микроформатных устройств для экстракции мРНК эукариот, макромолекулы которых имеют поли-А хвосты, способные эффективно комплементарно взаимодействовать с политимин дезоксирибонуклеотидами (поли-dT). В таких устройствах, напоминающих по принципу связывания НК упомянутую выше работу [89], могут, например, использоваться магнитные частицы с привитыми остатками олиго-dT [96], пористые монолиты, полученные на основе замещенных полиметакрилатов, поверхность которых модифицирована олиго-dT [97] и др.

Описанные выше принципы, положенные в основу создания микрофлюидных чипов, используются технологическими компаниями при разработке разнообразных устройств, отличающихся как своим назначением, так и степенью интегрированности различных подходов в составе одного устройства. Так, компанией Microfluidic systems Inc. (США) предложен микрофлюидный картридж для проведения дифференцированного лизиса различных типов клеток. С помощью этого устройства проводят ультразвуковую обработку образца и химический лизис, получая частично очищенную ДНК [98]. Стадии обработки образцов могут быть автоматизированы.

В компании Bio-Rad Laboratories, Inc. (США) разработано микрофлюидное устройство для очистки ДНК или РНК с помощью частиц диатомита и последующей амплификацией очищенных биомолекул с помощью ПЦР [99]. Американские исследователи [100] запатентовали микрофлюидное устройство для очистки геномной ДНК в результате ее селективного связывания на поверхности канала, модифицированного ДНК-связывающим реагентом, с одновременным определением количества связанной ДНК. Сотрудниками университета Виржинии (США) запатентовано микрофлюидное устройство, в котором очистка ДНК происходит в результате последовательного прохождения через серию микроколонок, селективно сорбирующих примеси при пропускании через систему подвижных фаз специального подобранного состава, причем последняя колонка селективно связывает ДНК [101].

Как правило, с помощью описанных устройств получают НК с невысоким выходом, а ввод реагентов на разных стадиях выделения и очистки необходимо осуществлять вручную.

Микрофлюидное устройство, разработанное компанией 3M Innovative Properties Company (США) для очистки и концентрирования НК (ДНК, РНК и ПНК –

пептидно-нуклеиновых кислот) из биологических и экспериментальных образцов [102], включает резервуар для загрузки образца и камеры для его обработки и перемешивания, которые соединены каналами. В качестве т. н. «осаждающих агентов» в устройстве используются частицы декстрана или желатина, которые либо вводят в микроканалы устройства или предварительно добавляют к образцу с целью получения фракции, обогащенной целевой НК. Как и другие микрофлюидные системы для очистки НК, эта система основана на многостадийном выделении НК, поэтому с ее помощью удается очищать НК лишь до известной степени, в основном, от ингибиторов ПЦР.

Сотрудники Национального университета Сингапура запатентовали монолитное микрофлюидное устройство для экстракции ДНК и РНК из крови [103], в котором используется кремнеземный носитель. Ввод образца, лизирующих растворов и элюента, очистка и выделение препарата НК осуществляются в системе, состоящей из каналов и клапанов, миниатюрной мешалки и камеры для лизиса.

Для устранения перекрестной контаминации компанией Sarnoff Corporation (США) предложено устройство для одновременного автоматического выделения НК из 24 биологических образцов [104]. В состав устройства входит кассета с 380 стрипами (полосками) для лизиса образцов и съемный герметичный контейнер для хранения и транспортировки стрипов с выделенной НК.

В компании Microchip biotechnologies, Inc. (США) разработана модульная система, в первом модуле которой происходит связывание и очистка НК на магнитных частицах с аффинным покрытием во вращающемся магнитном блоке. Лизат получают в проточном режиме в результате ультразвуковой обработки образца. Во втором модуле, представляющем собой микрофлюидное устройство, осуществляется анализ выделенной НК [105].

Компания Siemens AG (Германия) разработала одноразовый плоский картридж для автоматического анализа ДНК и белков. Картридж представляет собой систему миниатюрных каналов и емкостей, изначально заполненных сухими реагентами [106]. После ввода исследуемого биологического образца в картридж и выделения очищенных фракций биополимеров можно получить данные о свойствах выделенных биомолекул в результате помещения картриджа в совместимое с ним считывающее устройство.

Компанией Micronics Inc. (США) разработано одноразовое микрофлюидное устройство (карта), в котором одновременно выделяется ДНК и происходит ее амплификация [107]. В состав этого устройства, предназначенного для диагностики

некоторых бактериальных возбудителей в биологических жидкостях, встроена специальная мембрана, на которой концентрируются клетки, подвергающиеся затем лизису и амплификации. Полученный ПЦР-продукт элюируется с мембраны и передается на детектирующий элемент для визуализации.

Более сложное в техническом отношении устройство, разработанное в Пенсильванском университете (США) [108], представляет собой «лабораторию-на-чипе», предназначенную для ПЦР-диагностики некоторых бактериальных и вирусных возбудителей инфекций, определяемых в слюне. Система включает коллектор образца слюны, одноразовый микрофлюидный чип для его обработки со встроенной системой для лизиса, экстракции НК, проведения ПЦР и мечения ампликонов. Также в системе имеется платформа-контроллер, управляющая подачей реагентов, температурой, работой клапанов, а также сканер для считывания результатов.

Для анализа геномной ДНК компания Canon U.S. Life Sciences, Inc. (США) разработала устройство, включающее картридж, в котором проводится выделение ДНК (с помощью магнитных частиц либо носителей, изменяющих свои свойства под действием электрического заряда) и инжектор, передающий ДНК на микрофлюидный чип, имеющий зоны для ПЦР-амплификации, детекции и анализа ДНК [109].

Полностью автоматизированная портативная система на основе микрофлюидного чипа для обнаружения патогенных микроорганизмов методом ПЦР в реальном времени разработана компанией Cornell Research Foundation, Inc. (США) [110]. Система применима в лабораторных и в полевых условиях. В состав микрочипа включены модули для очистки ДНК и для ПЦР-детекции. После лизиса бактериальных клеток в присутствии хаотропных солей проводится отмывка НК водно-спиртовым раствором, в результате чего удаляются белки и липиды. В состав системы детекции включен микропроцессор, система клапанов и насосов, устройства для термоциклирования и флуоресцентной детекции.

Многофункциональное микрофлюидное устройство для диагностики вирусов гриппа разработано сотрудниками компании CombiMatrix Corp. (США). В состав устройства включены ДНК-микрочип (содержащий 12000 зондов) и микрофлюидный картридж, содержащий миниатюрные резервуары для реагентов, насосы, каналы, клапаны и мешалки. Непосредственно на чипе происходит синтез олигонуклеотидных зондов. Жидкости в устройстве перемешиваются за счет пропускания микропузырьков, генерируемых электрохимическими микронасосами. Аналогичные насосы используются для перекачивания жидкостей внутри картриджа. РНК, выделенные из образца, используются в ПЦР и в гибридизации на микрочипе. При

использовании этого автономного устройства не требуется вносить реагенты, что устраняет контаминацию образцов. С помощью устройства идентифицировали субтипы вируса гриппа А [111], а также исследовали экспрессию генов клеток лейкемии человека [112].

Таким образом, сегодня известно множество способов, обеспечивающих выделение и очистку НК в процессе пробоподготовки биологических образцов. Необходимые для этого манипуляции могут быть частично или полностью автоматизированы. Тем не менее, до сих пор не описано простое одноразовое универсальное устройство, которое обеспечивало бы быстрое и воспроизводимое выделение НК из биологических образцов различной природы с высоким выходом и низкой себестоимостью. Предлагаемые автоматизированные системы дороги и нередко сложны в эксплуатации, а использование более простых систем сопровождается неполной очисткой и недостаточным выходом НК. Часто эти системы предназначены для выделения НК из образца определенного типа (например, только из крови, слюны и др.) либо они пригодны для проведения анализа образца на присутствие НК только одного конкретного организма (или группы родственных организмов).

Не менее важный вывод заключается в том, что предлагаемые системы (как простые, предназначенные для ручного использования, так и полностью автоматизированные) основаны на реализации эффекта «позитивной селекции» в отношении выделяемой НК, что определяет многостадийность процесса выделения и неизбежные потери выделяемого компонента на каждой стадии.

Анализ цитированных источников подтверждает, что при выделении НК из биологических образцов предпочтение отдается методам, основанным на использовании твердых носителей, способных селективно и обратимо удерживать НК. В качестве таких носителей чаще всего применяют неорганические материалы, такие как кремнеземы, химически модифицированные кремнеземы, стекла, а также полимерные монолиты или композитные мембраны.

В следующих подразделах Главы 1 будут кратко рассмотрены способы получения (и свойства) носителей, наиболее часто применяемых при выделении НК, и полимерных модификаторов, используемых при получении сорбентов, селективно разделяющих компоненты биологических смесей (прежде всего биополимеров) в процессах хроматографии и твердофазной экстракции.

1.2. Носители для получения поверхностно-модифицированных сорбентов

1.2.1. Носители на основе кремнезема

Чаще всего в качестве неорганических носителей при синтезе поверхностно-модифицированных материалов используют аморфные пористые кремнеземы с известными структурными характеристиками (размер и форма частиц, величина удельной поверхности, диаметр и объем пор). Кремнеземы хорошо изучены, доступны и относительно дешевы. Благодаря низкой каталитической активности кремнеземной поверхности уменьшается вероятность протекания нежелательных побочных реакций (которые обычно наблюдаются при использовании носителей, обладающих высокой кислотностью).

Кремнеземы отвечают основным требованиям, предъявляемым к носителям: они не набухают в растворителях, стойки к воздействию органических растворителей, имеют жесткий каркас, отличаются термической и гидролитической стойкостью в физиологическом диапазоне pH. Благодаря жесткости каркаса сохраняется постоянная форма частиц и структурные характеристики носителя, что уменьшает риск физических потерь выделяемых веществ, снижает сопротивление в хроматографических колонках, повышает эффективность хроматографического разделения.

Растворимость кремнезема зависит от размера частиц, степени гидратации поверхности, наличия примесей и от температуры. В ряде известных работ, проанализированных в монографии Лисичкина с соавт. [113], показано, что аморфный кремнезем демонстрирует наибольшую растворимость в кислых средах при pH=0.1. В интервале pH=2-8 растворимость примерно постоянна, а при pH=7 - минимальна. В области pH=3-6 скорость растворения кремнезема пропорциональна концентрации гидроксид-ионов в растворе, и выше pH=9 экспоненциально растет. Начиная с pH=10.7 весь твердый кремнезем переходит в растворенный силикат. Термическая стабильность кремнезёмов зависит от их химической природы и меняется в широких пределах, однако, все кремнеземы стабильны в условиях выделения биополимеров с сохранением функциональных свойств последних.

Важной характеристикой кремнезёмов является поверхностная концентрация гидроксильных групп (предельная концентрация поверхностных гидроксильных /силанольных групп составляет 4.6-4.9 нм⁻² (т. е. примерно 8 ммоль/м²) [114,115]),

которая определяет количество функциональных групп молекул модификатора, которые могут быть химически связаны с поверхностью носителя.

Кремнезем (диоксид кремния SiO_2) существует в кристаллическом либо в аморфном состоянии. Кристаллический кремнезема представлен безводной или гидратированной формами. Безводный аморфный кремнезем имеет микропористое анизотропное (волокнистое или пластинчатое) строение или микропористое изотропное строение. Изотропные формы могут содержать воду. Аморфный кремнезем также может существовать в форме массивного кварцевого стекла [113].

Структуру кремнезема определяет способ его получения [116-119]. Так, силикагель получают из золя кремниевой кислоты $\text{Si}(\text{OH})_4$. Независимо от способа приготовления на первой стадии образуется истинный раствор кремнекислоты, из молекул которой в процессе поликонденсации формируются разветвленные цепочки поликремниевых кислот. По мере удлинения отдельных фрагментов цепей (может происходить и циклизация) макромолекулы поликремниевой кислоты образуют глобулярные частицы коллоидных размеров. С ростом мицелл увеличивается вязкость золя. Изменяя pH и состав среды, можно получать частицы золя размером от единиц до десятков нм. Устойчивость изначально стабильного золя может быть потеряна за счет разрушения сольватных оболочек или потери поверхностного заряда, в результате чего мицеллы золя связываются друг с другом, образуя трехмерную каркасную сетку. При этом золь превращается в гидрогель, при созревании которого частицы укрупняются, ориентируются, а иногда кристаллизуются [113, 119].

Отмытый от солей и высушенный гидрогель представляет собой так называемый «корпускулярный» ксерогель [113, 120], состоящий из сферических частиц, образующих пространственный каркас [119]. Размеры первичных сферических частиц золя сохраняются при переходе от золя к гидрогелю и затем к ксерогелю [117], а также после термической (гидротермальной) обработки.

В отличие от кристаллических форм кремнезема с неразвитой поверхностью для модифицирования, как правило, используют аморфный кремнезем. Берендсен [121] описал кремнезем как сильно деформированный кристалл, в котором содержится значительное число разорванных связей Si-O, при этом на каждую разорванную связь возникают две добавочные OH-группы, образующие водородную связь [113, 121]. Из этого следует, что поверхность кремнезема можно рассматривать как усредненный поверхностный слой гипотетического кристалла, в котором число свободных гидроксильных групп сохраняется, а число связанных гидроксильных групп равно удвоенному числу разорванных связей Si-O. Проще говоря, поверхность

аморфного кремнезема представляет собой набор микроучастков с различной поверхностной структурой.

На поверхности кремнезема существуют силанольные и силоксановые группы, соотношение которых варьируется в зависимости от степени дегидроксилирования поверхности [122]. Силанольные группы значительно легче вступают в химические реакции, чем силоксановые (поскольку силанольный протон имеет слабокислый характер и легко вступает в реакции обмена) [116]. В известном исследовании Снайдера [123] показано, что на поверхности кремнезема можно определить пять видов групп, присутствующих в различных соотношениях (Рисунок 1.3). Эти группы включают силанольную (связанную) воду, то есть отдельно стоящие гидроксильные группы; физически связанную воду (молекулы воды, связанные водородными связями с силанольными группами); силоксановые группы (дегидратированные оксиды); близнецовые (геминальные) гидроксильные группы, связанные с одним атомом кремния; реакционноспособные вицинальные гидроксильные группы (преобладающие в тонкопористых кремнеземах) – соседние, близко расположенные гидроксильные группы, связанные между собой водородной связью.

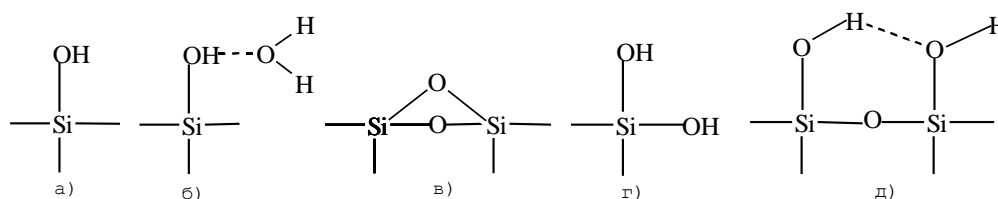


Рисунок 1.3 - Функциональные группы на поверхности кремнезема: а - силанольная (связанная) вода; б – физически связанная вода; в - дегидратированные оксиды (силоксановые группы); г - близнецовые (геминальные) гидроксильные группы; д - вицинальные гидроксильные группы [113,123].

Для выделения чистых препаратов биополимеров часто требуются модифицированные крупнопористые носители, которые получают на основе пористых стекол. Пористые стекла изготавливают в результате спекания частиц диоксида кремния с оксидами других химических элементов с последующим вымыванием растворимых в щелочи или кислоте продуктов. Размеры пор пористых стекол могут достигать нескольких сот нм при сохранении достаточной прочности частиц. В промышленности выпускают несколько типов пористых стекол [113], получаемых из расплава боросиликатного стекла. Выдерживание расплава при более низкой температуре приводит к его разделению на две несмешивающиеся жидкие

фазы, которые в определенных условиях образуют взаимопроникающие сетки. Затвердевание сеток можно осуществить на любой стадии. Борсодержащие примеси удаляют обработкой сильной кислотой. Таким способом получают чистое высокопористое стекло. После последующей обработки щелочью поры в пористом стекле имеют диаметр 60-100 нм. Изменяя продолжительность контакта стекла с кислотой, можно получить как объемно-пористые, так и поверхностно-пористые стекла (в результате обработки кислотой изменяется лишь глубина травления, но не размеры пор).

Как правило, для получения поверхностно-модифицированных сорбентов (в том числе сорбентов, модифицированных полимерами) используют пористые неорганические носители, к которым относятся силикагель, диатомиты и пористые стекла. Свойства сорбентов варьируются в зависимости от размеров пор.

По размерам пор сорбенты разделяют на три основные группы: макропористые сорбенты с порами, эффективный диаметр которых превышает 50 нм, мезопористые сорбенты с диаметром пор 2-50 нм и микропористые - с диаметром пор меньше 2 нм.

С учетом особенностей структуры выделяют поверхностно-пористые сорбенты, имеющие размер частиц 20-40 мкм, причем приповерхностный слой толщиной 2-3 мкм пронизан системой пор, а ядро частицы непористое. В качестве примера поверхностно-пористых сорбентов, состоящих из частиц с непроницаемой сердцевинной и тонкой пористой оболочкой, можно упомянуть зипакс (носитель с контролируемой поверхностной пористостью), корасил и поверхностно-травленные стекла [113, 124].

Большинство применяемых носителей относят к группе объемно-пористых материалов, в которых система пор пронизывает весь объем частицы.

Наконец, в качестве материалов для упаковки современных ВЭЖХ-колонок выпускаются макропористые микрочастицы диаметром 3-10 мкм.

1.2.2. Стекланные мультикапилляры – перспективный носитель для создания полимермодифицированных композитов и микрофлюидных устройств

В контексте этого литературного обзора и последующих глав представляется необходимым хотя бы очень кратко остановиться на таком объекте, как стекланные мультикапилляры. Эти многоканальные структуры представляют интерес в качестве

нетрадиционных носителей для получения полимермодифицированных композитов, демонстрирующих эффект «негативной селекции» в отношении НК.

Ранее в работе [125] было предложено использовать такие структуры (мультикапилляры) в составе ряда простых устройств, предназначенных для выделения и очистки биополимеров (или клеток) в результате реализации эффекта «положительной селекции». Стеклообразные микроструктурированные волокна могут быть получены, например, с помощью традиционной волоконной технологии перетягиванием пакета (пучка) гексагонально уложенных капилляров (стеклянных или кварцевых), причем при укладывании пакета должен быть допущен дефект как минимум в виде отсутствия одного или нескольких капилляров [126].

В результате получают мультикапиллярную структуру. Варьируя число и диаметр капилляров в таких структурах, можно получать мультикапилляры с заданной площадью поверхности (т. е. обеспечивать определенную сорбционную емкость в случае, если удастся разработать эффективные способы модифицирования поверхности капилляров сорбционно-активными соединениями). Возможность вставки (впаивания) мультикапилляров в наконечники для механических и автодозаторов или в компоненты других устройств (таких как центрифужные пробирки, кюветы и др.) существенно облегчает работу с ними [125].

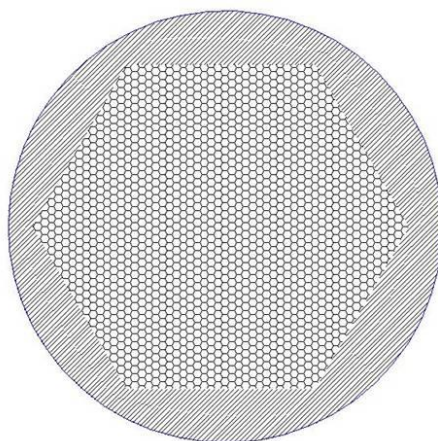


Рисунок 1.4 – Пакет стеклянных капилляров с обрамлением. Вид с торца [126].

На Рисунке 1.3 представлено торцевое изображение стеклянного мультикапилляра (диаметр каналов которого может варьироваться в пределах 1-100 мкм), имеющего макроструктуру, оптимальную для разработки технологической схемы вставки – впаивания - требуемого фрагмента такого изделия в пластиковый наконечник для дозатора. Такие мультикапилляры получают в результате процесса, когда по периметру пакета капилляров укладывают от одного до трех рядов

стеклянных стержней обрамления, причем диаметр таких стержней должен быть сопоставим с удвоенной длиной апофемы торцевого сечения гексагонального пакета, а единственный стеклянный стержень должен иметь оболочку из легкоплавкого стекла. Именно такая технология позволяет осуществлять укладку и перетяжку макроразмерных элементов, содержащих микроразмерные структуры [126].

1.2.3. Синтетические мембраны как перспективный носитель для получения полимерсодержащих сорбентов

Наряду с объемно-пористыми кремнеземами и стеклянными мультикапиллярами в качестве носителей для получения композиционных полимерсодержащих сорбентов полезны синтетические полимерные мембраны. Использование мембранных носителей позволит упростить технологии модифицирования их поверхности (по сравнению с дисперсными или капиллярными носителями) и последующее использование получаемых биосепарирующих элементов.

Необходимо отметить, что в контексте данного обзора и диссертационного исследования в целом, мембрану следует рассматривать не как селективно проницаемое препятствие между двумя фазами (или проще говоря, фильтр), но именно как твердый носитель, который может быть использован при синтезе композитов в качестве подложки для нанесения полимерных нанослоев.

Различают непористые (диффузионные) и пористые полимерные синтетические мембраны. В первом случае мембрана представляет собой квазигомогенный гель, через который молекулы растворителя и растворенного вещества проникают за счет молекулярной диффузии. В пористой мембране (которая, по сути, является капиллярно-пористым телом) микроскопические просветы между элементами структуры, как правило, образованы сеткой сквозных капилляров [127, 128].

Наиболее распространенные методы получения полимерных пористых мембран могут быть сведены к четырем группам.

Методы, отнесенные к первой группе, основаны на формовании мембран из раствора полимера методом инверсии фаз. Такое формование проводят либо «сухим методом» в результате удаления растворителя за счет его испарения (для чего полимерный раствор в смеси растворителя и осадителя выдерживают на воздухе) или «мокрым способом», удаляя растворитель при его вытеснении осадителем методом

диффузии последнего (для чего полимерный раствор погружают в осадитель). Этим методом получают ультра- и микрофильтрационные мембраны на основе полисульфона, полиэфирсульфона, поливинилиденфторида, сополимера тетрафторэтилена с винилиденфторидом, полиакрилонитрила, сложных эфиров целлюлозы, полиимида, полиэфиримида, полиамида, полиамидоимида, поликарбоната [127].

Вторая группа методов включает формование мембран из расплава полимеров в результате его экструзии через фильеру. Пористая структура (с размерами пор 0.1-3 мкм) образуется в результате появления микротрещин под действием механического напряжения или вымывания предварительно добавленных в расплав порообразователей. В этих методах используют политетрафторэтилен, дитиокарбонат целлюлозы, полипропилен [127].

Методами, относящимися к третьей группе, удается получать микрофильтрационные мембраны с размером пор 0.1-10 мкм за счет прессования полимерных элементов определенного размера (порошки, волокнистые дисперсии или волокна) с последующим их спеканием [127, 128]. Чаще всего с этой целью используют дитиокарбонат целлюлозы, полипропилен, политетрафторэтилен, поливинилхлорид.

В четвертой группе методов используется радиационная обработка с последующим химическом травлением тонких монолитных пленок, предварительно полученных из полиэтилентерефталата, полипропилена, поликарбоната или полиэтиленнафталата. Этим методом получают так называемые трековые мембраны («ядерные фильтры»), диаметр пор которых составляет 0.02-10 мкм, а пористость создается благодаря выщелачиванию полимера, предварительно локально разрушенного действием ускоренных заряженных частиц [129].

В отдельную группу следует выделить композиционные мембраны, состоящие из двух и более слоев, состоящих из предварительно полученных материалов с разными свойствами. Как правило, композиционную мембрану получают нанесением ультратонкого слоя конкретного вещества на пористый слой, состоящий из иного вещества [130].

Доступным и недорогим полимерным сырьем, обладающим комплексом полезных свойств, являются термопластичные алифатические полиамиды (ПА, капрон, nylon-6, nylon-66), из которых методом «мокрого формования» получают микропористые капроновые мембраны (ММК) с размерами пор в диапазоне 0.1-3 мкм [131-133].

Таким образом, можно предположить, что использование синтетических полимерных пористых мембран в качестве основы для получения композиционных сорбентов для выделения биополимеров окажется не менее перспективным, чем использование неорганических матриц. Можно ожидать, что при использовании полимерных мембран в качестве носителей станет возможным не только обеспечить требуемые механическую прочность, химическую стойкость и площадь поверхности, но также эффективно использовать специфические функциональные группы, присутствующие на поверхности мембраны, например, в качестве якорных групп для иммобилизации молекул полимерного модификатора.

1.3. Полимерсодержащие сорбенты для выделения и очистки биологически активных соединений. Методы получения, модификаторы и области применения

Для обобщения требований, предъявляемых к свойствам полимерсодержащих композиционных сорбентов, необходимо проанализировать известные данные о взаимосвязи структуры и свойств таких материалов. Сведения о накоплении таких данных в определенной мере отражает хронологию проводимых в этой области исследований. В данном подразделе обзора научных источников рассмотрены основные способы иммобилизации полимерных фаз на поверхности твердых носителей и примеры применения получаемых сорбентов. Некоторые источники, упомянутые в разделе 1.3.1, цитировались ранее, например, в [134-139]. Однако в силу значимости представленных в них результатов целесообразно еще раз упомянуть эти работы в настоящем обзоре. Специальные подразделы посвящены методам получения и свойствам перфторсодержащих сорбентов, а также свойствам полианилина как перспективного модификатора при получении композитов, пригодных для выделения и очистки биополимеров. Наконец, кратко рассмотрены способы получения силанированных кремнеземов, поскольку последние были использованы в настоящем исследовании в качестве основы при синтезе некоторых полимерсодержащих сорбентов.

1.3.1. Сорбенты, получаемые в результате физической адсорбции или хемосорбции полимеров на поверхности носителя

Около 30 лет назад Andrade с сотр. предприняли одну из первых попыток качественного объяснения эффектов, наблюдаемых при взаимодействии белков крови

с поверхностью носителя, покрытого слоями нейтральных блоксополимеров полиэтиленоксида с полипропиленоксидом или с полибутиленоксидом. Они предположили, что причиной подавления сорбционной активности исходного носителя (полиэтилена низкой плотности) полимерной фазой, иммобилизованной на его поверхности, может являться низкая поверхностная свободная энергия полимерной фазы [140]. На момент проведения исследования значения поверхностной энергии для некоторых полимеров были известны (в частности, 52.6 мДж/м² для полиэтилена и 3.1 мДж/м² для поливинилового спирта [141]). В работе [142] было показано, что адсорбция белков сыворотки заметно возрастает на полимерах, отличающихся высокими значениями межповерхностной свободной энергии.

Важные выводы, во многом определяющие последующие исследования в области создания композиционных сорбентов с иммобилизованными полимерными фазами сделаны в работе [143], в которой оценивали адсорбцию сывороточных белков (в мкг/см²) из сред, различающихся значениями свободной межфазной энергии, в зависимости от значений поверхностной энергии носителя. Уменьшение межфазной свободной энергии (иными словами, возрастание межфазной энергии носителя-субстрата γ_{sv}) приводило к понижению сорбции белков в средах с более высокой межфазной энергией (например, в фосфатном буфере) по сравнению со средами с низкой свободной межфазной энергией (например, в смесях диметилсульфоксида с водой). В этой же работе приводится уравнение, описывающее изменение свободной энергии Гельмгольца (ΔF_{ads}) при адсорбции макромолекул:

$$\Delta F_{ads} = \gamma_{ps} - \gamma_{pl} - \gamma_{sl}.$$

Справа в уравнении представлены значения межфазного натяжения при взаимодействии белка и твердой фазы (ps), белка и жидкости (pl), твердой фазы и жидкости (sl), соответственно. Уравнение справедливо при отсутствии специфических взаимодействий между сорбатом и сорбентом (твердой фазой). Таким образом, свободная энергия адсорбции белковых макромолекул на поверхности сорбента определяется как значениями поверхностной энергией молекул сорбата и сорбента, так и поверхностной энергией растворителя. В результате оказывается, что если свободная межповерхностная энергия растворителя (γ_{lv}) меньше, чем у белка (γ_{pv}), то с увеличением поверхностной энергии сорбента (γ_{sv}) уменьшается изменение свободной энергии Гельмгольца (ΔF_{ads}), определяя тем самым повышение сорбции белка. И наоборот: если $\gamma_{lv} > \gamma_{pv}$, то изменение свободной энергии Гельмгольца возрастает с ростом γ_{sv} , а сорбция белка на полимере снижается. Таким образом, сорбенты с

минимальным уровнем неспецифической сорбции (например, сорбенты для эксклюзионной или аффинной хроматографии) должны быть максимально гидрофильными.

В работе [144] использовали представление о гипотетической структуре поверхности с минимальной поверхностной энергией, на основании чего был сделан вывод об идеальности поверхностей адсорбированных водорастворимых полимеров, слои которых подавляют адсорбционную активность поверхности носителя. Поскольку адсорбированные макромолекулы образуют экспонированные в объеме среды «хвосты» и «петли», вероятность конформационных изменений в молекулах сорбата снижается. Это уменьшает подвижность иммобилизованных на поверхности носителя групп и свободную энергию межповерхностного взаимодействия, что понижает общую энтропию системы. Взаимодействие цепей с молекулами «хорошего растворителя» (например, с молекулами воды) понижает значение энтальпийного фактора, что в свою очередь оказывает влияние на значение свободной энергии всей системы [145]. Это приводит к переориентированию адсорбированных молекул в соответствии с их микроокружением, чем облегчается их контакт с молекулами сорбата (белка).

С начала 70-х годов прошлого века в США, Японии и в Европе адсорбцию макромолекул интенсивно исследовали с использованием теоретических и экспериментальных моделей [146-155]. Как правило, результаты исследования равновесной адсорбции полимеров сводились к достижению баланса энтропийного и энтальпийного факторов, наличия электростатических взаимодействий между фрагментами полимерной цепи и поверхности носителя, а также к гидрофобным взаимодействиям. Было показано, что при обратимой адсорбции нейтральных полимеров важно соотношение четырех факторов: энергии сегментальной адсорбции (движущая сила адсорбции); энтропии конформации цепей (энтропия макромолекул в адсорбированном состоянии уменьшается по сравнению с макромолекулами в растворе); энтропии смешения сегментов и растворителя (определяет границу между поверхностью и раствором). Два последних фактора действуют в противоположном направлении. Четвертый фактор - межсегментальное взаимодействие (проще говоря, сумма взаимодействий полимер-полимер, растворитель-растворитель и полимер-растворитель) – как правило, способствует накоплению сегментов в растворе. При конечной концентрации устанавливается равновесие, при котором существуют адсорбированные макромолекулярные слои с «петлями» и «хвостами».

При адсорбции полиэлектролитов также необходимо учитывать электростатический фактор. Если поверхность сорбата заряжена, то изменение энергии сегментальной адсорбции определяется знаком и величиной заряда. Полиэлектролит будет адсорбироваться в случае, когда энергия адсорбции превышает энергию межсегментального взаимодействия и взаимодействия между сегментами и поверхностью. При электростатическом взаимодействии между сегментами уровень адсорбции понижается. Кроме того, адсорбция полиэлектролитов сильно зависит от ионной силы раствора. В разбавленных растворах (со слабой ионной силой) сегменты стремятся максимально удалиться друг от друга, адсорбированный слой утончается, количество «хвостов» снижается.

В работе [156] показано, что адсорбция полимеров усиливается на шероховатых (фрактальных) поверхностях, поскольку при этом снижены «энтропийные затраты», в то время как на гладкой поверхности из того же материала полимер не адсорбируется. Возрастание фрактальности приводит к утолщению адсорбированного слоя. Кроме того, гибкоцепные макромолекулы адсорбируются сильнее, чем жесткие полимеры.

Важные закономерности выявлены в [157] при исследовании конформации цепей полиэтиленоксида (ПЭО) в слоях, сформированных в результате физической адсорбции на силикагеле за счет выпаривания растворителя. Благодаря введению спиновой метки в концевые группы ПЭО выявлена зависимость конформации цепей от количества иммобилизованного полимера (т. е. от площади поверхности, приходящейся на одну молекулу). При низких поверхностных концентрациях ПЭО были обнаружены как малоподвижные молекулы, взаимодействующие с полярными силанольными группами, так и подвижные цепи, экспонированные в объем раствора. При двукратном увеличении поверхностной концентрации обнаруживали только подвижные цепи, т. е. конформация цепей становилась более «рыхлой». Следует отметить, что и в работах [147, 148] утверждалось, что основной вклад в толщину адсорбционного слоя вносят длинные петли и «хвосты», экспонированные в раствор.

При исследовании адсорбции образцов полистирола, различающихся молекулярной массой и молекулярно-массовым распределением, на пористом стекле с диаметром пор 1000 Å. [158], было установлено, что интенсивность обмена компонентов адсорбированного полимерного слоя между твердой фазой и раствором зависит не только от молекулярной массы полимера, но исходной концентрации его раствора. Оказалось, что макромолекулы, адсорбированные из концентрированных растворов, обмениваются интенсивнее, чем адсорбированные из разбавленных

растворов. Авторы работ [158, 159] сделали очевидный вывод о том, при адсорбции из концентрированных растворов макромолекулы взаимодействуют с поверхностью посредством меньшего числа сегментов, чем при адсорбции из разбавленных растворов (когда макромолекулы связываются с поверхностью большим числом сегментов и имеют более «распластанную» конформацию). Несколько ранее Костроув рассчитал, что полимерная цепь экспонируется в раствор при условии, что энергия связывания мономерного звена с поверхностью превышает 2 kT [160]. В концентрированных растворах макромолекула имеет доступ к меньшей площади поверхности и адсорбируется меньшим числом сегментов (особенно, если на поверхности уже присутствуют ранее адсорбированные молекулы), вследствие чего молекула легче десорбируется.

Несложно заключить, что молекулы полимеров, принимающие в результате сорбции на поверхности носителя «распластанную» конформацию, будут более эффективно подавлять неспецифическую адсорбцию молекул сорбата (в частности, биополимеров) за счет экранирования поверхности носителя.

Важно заметить, что модельные сорбенты, активно используемые при исследовании механизмов адсорбции на твердых поверхностях, а также сорбенты, получаемые на базе разработанных при этом методик, стали быстро заполнять нишу сорбционных материалов, с успехом применяемых на практике для выделения и очистки биологически-активных соединений. Так, сорбенты, полученные в результате физической адсорбции нейтральных полимеров на поверхности кремнеземов, в ряде случаев оказались пригодны для выделения и очистки биополимеров. В этих материалах полимерная фаза удерживается за счет большого числа слабых взаимодействий сегментов макромолекул с поверхностью носителя. В работе [161] сорбент получали обработкой водным 0.4 % раствором полиэтиленоксида (массой около 100000) пористого стекла (диаметр пор 1250 \AA). Этот материал не сорбировал некоторые вирусы, что позволило проводить их очистку от примесей. Аналогичный кремнезем, модифицированный полиэтиленгликолем (массой 20000) [162], оказался эффективен при препаративном выделении вируса миелобластоза из плазмы цыпленка в результате эксклюзионной хроматографии. Щелочные белки ($pI > 7.5$) удерживались на поверхности сорбента необратимо. Покрытие поли-N-винилпирролидона [163] на поверхности кремнезема оказалось пригодным для разделения смесей некоторых белков.

С целью повышения устойчивости полимерных покрытий исследовали адсорбцию заряженных полимеров на кремнеземах. В работе [164] было показано, что

поли-1,2,4-триазол необратимо сорбируется на поверхности пористых стекол, по-видимому, за счет электростатического взаимодействия и многочисленных водородных связей. Полученный сорбент использовали для очистки некоторых вирусов с сохранением их антигенных и иммунных свойств. Устойчивые покрытия были получены на основе катионогенных производных декстрана, которые активировали бромцианом для иммобилизации антигена [165] при получении аффинных сорбентов для выделения антител. Такой сорбент удалось регенерировать без изменения емкости и селективности. Исследование свойств силикагелей, модифицированных декстранами, различающимися молекулярной массой и содержанием ДЭАЭ-групп [166], показало, что на сорбционные свойства таких сорбентов оказывает влияние не молекулярная масса модификатора, а количество ДЭАЭ-групп. Содержание ДЭАЭ-групп в диапазоне 4 – 10% оказалось оптимальным. При более низком их содержании на удерживании молекул сорбата (различных белков) сказывалось влияние поверхностных групп кремнезема (неспецифическая сорбция), а при содержании ДЭАЭ-групп свыше 10% сорбент приобретал анионообменные свойства за счет положительного заряда поверхности.

Одним из приемов, разработанных с целью повышения устойчивости иммобилизованного полимерного покрытия, стала химическая сшивка адсорбированных макромолекул с помощью бифункциональных или олигофункциональных реагентов. Например, в работе [167] на поверхности силохрома (диаметр пор 1000-1300 Å) адсорбировали поливиниловый спирт, затем сшивали эпоксидной смолой и вводили алкильные радикалы. С помощью этого материала выделяли микробные липазы. В исследовании [168] поливиниловый спирт адсорбировали на цеолите и сшивали эпихлоргидрином. На поверхности полученного материала иммобилизовали группоспецифичный лиганд для выделения киназ и дегидрокиназ (краситель Cibacron Blue 3G-A). В ряде работ на поверхность пористых силикагелей адсорбировали разветвленный полиэтиленимин (массой 600 Да) из растворов в метаноле [169]. Покрытие сшивали тетраглицидиловым эфиром пентаэритрита, диглицидилэтиленгликолем [170] и глутаровым альдегидом [171]. Аминогруппы в полученных материалах удается кватернизовать обработкой метилиодидом. В результате получали сорбенты, способные разделять смеси тРНК, а при добавлении в подвижную фазу 15% ацетонитрила – смеси олигонуклеотидов длиной 30–50 оснований [172].

В приведенных выше примерах описывались способы получения композитов, содержащих полимерные фазы, физически иммобилизованные на поверхности

неорганических носителей, а также результаты их использования при разделении компонентов различных биологических смесей. С целью повышения физико-химической стойкости полимерных покрытий и придания им селективности в хроматографических процессах независимо проводились исследования свойств материалов, получаемых в результате ковалентной пришивки полимерных молекул к поверхности носителя. Оказалось, что в результате хемосорбции значительно снижается неспецифическая сорбция молекул сорбата на поверхности носителя. Кроме того, появляется возможность вводить в состав покрытия спейсоры между поверхностными группами носителя и биоспецифичными лигандами с получением аффинных сорбентов, что было показано в ряде работ. Так, например, еще в начале 70-х годов прошлого века Вильчек [173] доказал возможность ковалентной пришивки полилизина и поливиниламина к сепарозе. Позже в работах Даванкова с сотр. [174] в качестве ковалентно пришитых поверхностных модификаторов кремнеземов использовали сополимеры стирола с метилэтилдиэтоксисиланом. Методами ртутной порометрии и эксклюзионной хроматографии с применением полистирольных стандартов оценивали объем пор и распределение пор по размерам в полимерном покрытии полученных материалов. Важно отметить, что в результате хроматографического исследования наблюдали весьма заметное уменьшение диаметра пор носителя после модифицирования, в то время как результаты ртутной порометрии указывали на незначительное уменьшение этой величины. Полученные различия обусловлены физико-химическими факторами. В процессе хроматографии полимерная фаза сольватирована молекулами растворителя и находится в «набухшем» состоянии, что снижает проницаемость полистирольного стандарта. При порометрии полимерная фаза сорбента не набухает.

Во многих работах исследовали сорбенты, различающиеся степенью гидрофобности. Такие сорбенты можно получить, например, в результате хемосорбции полиэтиленимина на поверхности силикагеля, обработанного 2-(карбометокси)-этилтрихлорсиланом (КМЭТС). Ацилированием остаточных аминогрупп ангидридом дикарбоновой кислоты получали катионообменники для разделения смесей белков [175]. В другом варианте кремнезем, модифицированный КМЭТС и тетраэтиленпентамином, ацилировали хлорангидридами жирных карбоновых кислот [176]. С колонок, содержащих полученные сорбенты, все белки (за исключением лизоцима) выходили в свободном объеме при низкой ионной силе элюента. С целью получения сорбента для катионообменной и гидрофобной хроматографии белков на поверхность силикагеля с аминопропильными группами

Альперт хемосорбировал нейтральный полисукцинимид [177]. Поверхность полученного материала затем была подвергнута различным полимераналогичным превращениям, в частности, гидролизу с образованием полиаспарагиновой кислоты или конденсации с β -аланином с образованием ковалентно пришитого сополимера 2-карбоксиэтиласпартамида и аспартановой кислоты. Автор этой работы [177] объяснял высокую ионообменную емкость полученных сорбентов и их способность десорбировать белки «пептидностью» иммобилизованных полимерных фаз и их «пушистостью» (наличием развитой полимерной поверхности с ионизованными группами, локализованными на концах цепей на удалении от поверхности носителя).

В середине 80-х годов много работ было посвящено созданию «мягких» стационарных фаз на основе полиэтиленоксида (ПЭО) для гидрофобной хроматографии белков и НК, для выделения ферментов с сохранением их активности. В качестве носителей использовали, например, силикагели, обработанные реакционноспособными силанами и аллиловыми эфирами олигоэтиленоксида [178]. В исследовании [179] было показано, что природа соли в составе элюента, структура силана и молекулярная масса ПЭО оказывают различное влияние на эффективность разделения в зависимости от молекулярной массы и природы молекул сорбата (в качестве последних использовали т-РНК и белки). В работе [180] сорбенты с «мягкими» стационарными фазами получали, обрабатывая силикагель 3-глицидоксипропилтриметоксисиланом и низкомолекулярным полиэтиленгликолем. С помощью полученного сорбента удалось разделить смесь шести белков в изократическом режиме.

Сорбенты с устойчивыми полимерными фазами, характеризующиеся низким уровнем неспецифической сорбции биополимеров, были получены в результате хемосорбции поли-*n*-нитрофенилакрилата на аминопропилкремнеземе [181]. Вначале макромолекула взаимодействует с поверхностными группами носителя несколькими звеньями цепи. Затем макромолекулы адаптируются к поверхности. При введении в реакцию смесь уксусного ангидрида ацилированию подвергалось не менее 70% аминопропильных групп, в результате чего первичные аминогруппы становились нейтральными ацетиламидными группами (следовательно, снижался уровень неспецифической сорбции заряженных биомолекул). *n*-Нитрофенильные группы могут вступать в реакцию с первичными аминами с образованием амидной связи с выделением в раствор *n*-нитрофенола, благодаря чему при хемосорбции с помощью УФ-спектроскопии оказалось возможным исследовать конформационные изменения при хемосорбции. Сходные свойства демонстрируют гидрофобные сорбенты,

полученные Ивановым с сотр., модифицированные бутиламином и фениламином [182], эффективные при ВЭЖХ белков (а бутилированный сорбент – также при выделении различных вирусов). Зубов с сотр. в серии работ (например, [183, 184]) «сконструировали» сорбенты с заданными свойствами в результате иммобилизации на поверхность широкопористых аминопропил-кремнеземов водорастворимых сополимеров N-винилпирролидона и акрилоилхлорида. В результате обработки остаточных хлорангидридных групп моноэтаноламином, последние были преобразованы в 2-гидроксиэтиламидных группы. Полимерные фазы таких сорбентов оказались гидрофильными и «диффузными». 90% сорбционно-активных групп содержались в «петлях» и «хвостах» и оставались свободными. Эти материалы оказались эффективны при выделении с количественным выходом ряда вирусов, а также РНК из смеси, содержащей бактериальные рибосомальные фрагменты 70S.

1.4. Сорбенты с привитой полимерной фазой

Новые возможности для «конструирования» композиционных сорбентов открыла разработка методов графт-полимеризации, с помощью которых на поверхности твердого (чаще неорганического) носителя можно формировать полимерную фазу, минуя стадию адсорбции предварительно полученного полимера, поскольку полимеризация происходит непосредственно в присутствии носителя. В ходе графт-полимеризации полимерные цепи растут от поверхности носителя, кроме того может осуществляться прививка «живых» цепей к поверхности подложки.

Для осуществления графт-полимеризации необходимо присутствие на модифицируемой поверхности носителя доступных активных участков (функциональных групп). В случае кремнеземов в качестве таких активных групп могут выступать поверхностные гидроксильные и/или силоксановые группы, а также металлсодержащие группы примесей, как правило, содержащихся в кремнеземах. Для химической модификации групп на кремнеземных поверхностях чаще всего используют органосиланы. В зависимости от структуры прививаемого силана, получают носители с различными свойствами поверхности. Способы модифицирования кремнеземных поверхностей с использованием силанов кратко рассмотрены в следующем подразделе Главы 1.

Реакционноспособные центры можно получать в результате «сухой» активации поверхности носителя механохимическими реакциями в процессе истирания или расщепления носителя [185]. Подобные способы (наряду с активацией поверхности

минеральных носителей с помощью плазмы [186]) применяют при получении высоконаполненных композитов на стадии синтеза. Образование реакционных центров, участвующих в графт-полимеризации, может происходить при радиационном облучении либо под действием инициаторов свободных радикалов. Молекулярные механизмы таких процессов исследованы еще в 80-х годах прошлого века, например, в [187, 188].

Были разработаны различные способы проведения радиационно-инициированной полимеризации [189], включающие как прямое облучение системы мономер-носитель (когда используемый мономер можно применять непосредственно, если он жидкий, либо в виде раствора, в газообразном состоянии или в виде пара), так и прививку мономера на предварительно облученную в инертной атмосфере (или в вакууме) поверхность (так называемая «пост-полимеризация»). В последнем случае, как правило, мономер использовали в газообразном состоянии или в виде пара.

Радиационно-иницированная полимеризация в присутствии твердого носителя наиболее эффективно протекает в слоях мономера, адсорбированных на его поверхности [190]. При облучении кремнеземов (то есть при радиоллизе) образуются поверхностные радикалы SiO^* и Si^* , в результате чего на кремнеземной поверхности можно полимеризовать, например, стирол, метилметакрилат, акрилонитрил, винилацетат, *n*-бутилметакрилат и *N*-винилпирролидон. Из данных, приведенных в упомянутом обстоятельном обзоре [190], посвященном исследованию радиационно-инициированной полимеризации мономеров, адсорбированных на твердых поверхностях, следует, что присутствие в системе низкомолекулярных радикалов H^* и OH^* , химически не связанных с поверхностью, может стать причиной образования большого количества непривитого гомополимера при прямом облучении. Этот эффект типичен для случаев прививки полимеров из жидкой фазы. Напротив, при прививке из паровой фазы образуется незначительное количество гомополимера, а прививка полимера к поверхности осуществляется даже при низком выходе активированных участков, возникающих в результате радиолиза. В [191] показано, что в ряде случаев количество привитого полимера прямо зависит от дозы облучения и имеет предельное значение (поскольку концентрация образующихся в результате облучения активных центров на поверхности кремнезема сначала линейно повышается, а затем выходит на плато).

В работе [192] было показано, что скорость низкотемпературной пост-полимеризации, протекающей на поверхности пористых носителей, определяется концентрацией мономера (тетрафторэтилена), адсорбированного на поверхности

носителя, но не его содержанием в газовой фазе. При этом важно контролировать условия полимеризации во избежание закупорки пор матрицы.

В результате γ -облучения деаэрированной водной суспензии цеолита в присутствии 2-оксиэтилметакрилата и N,N'-метиленабисакриламида с последующей иммобилизацией красителя Cibacron Blue F-3A получали сорбент, эффективно удерживающий белки [193].

Композиционные сорбенты с привитой полимерной фазой могут быть получены в результате иницирования полимеризации винилсодержащих мономеров на поверхности силикагеля при введении в реакционную систему инициаторов свободно-радикальной полимеризации (то есть без применения источника радиации). С этой целью разработаны различные способы. Инициатор может быть введен путем ковалентной пришивки к подложке (в этом случае увеличивается выход привитого полимера, но одновременно образуется значительное количество гомополимера). Инициатор может быть физически адсорбирован из раствора на поверхности носителя. Наконец, инициатор может быть введен в мономер (если мономер жидкий) или в раствор мономера.

Для получения однородных устойчивых привитых полимерных покрытий на поверхности твердых носителей разработан ряд приемов. Во-первых, используют мономеры, содержащие реакционноспособные группы (например, после обработки макропористого стекла 2,3-эпоксипропилметакрилатом и последующей полимеризации получали однородное полимерное покрытие с сохранением пористости исходного носителя [194]). Во-вторых, для прививки полимеров на поверхность кремнеземных носителей поверхность последних предварительно активируют, например, органосиланами, которые способны сополимеризоваться с винилсодержащими мономерами (метилметакрилат, акрилонитрил, акриловая и метакриловая кислоты, стирол, N-винилпирролидон, бинарные смеси триэтоксивинилсиланстирола или триэтоксивинилсилан-метилметакрилата с винилсодержащими мономерами и др.) [187, 195-198]. В-третьих, используют бифункциональные сшивающие агенты (например, дивинилбензол в присутствии *азо-бис-изобутиронитрила*), вводя их в систему с суспендированными частицами носителя. Образующийся в жидкой фазе полимер адсорбируется на поверхности частиц носителя с образованием трехмерной сетки [199].

В работе [200] получали аффинные сорбенты на основе широкопористых силикагелей, содержащих поверхностные гидроксильные группы, последовательно проводя силанизацию с помощью органосиланов с галогенсодержащими, алкокси-,

алкил- или арильными группами, а затем – поверхностную (со)полимеризацию бифункциональных винильных мономеров и иммобилизацию подходящих биолигандов. Таким способом был получен ряд материалов, например, с привитыми сополимерами N-метилолакриламида с N-замещенными акриламидами с активированными сложноэфирными N-оксисукцинимидными группами, а также с аллиламином и N-аллилбромацетамидом, химически модифицированными диольной фазой. При повышенной температуре в присутствии каталитических количеств кислоты метильные группы взаимодействуют с гидроксилами глицерилпропильной фазы с образованием простых эфирных связей; также может отщепляться вода с образованием связи между атомами азота через промежуточную метиленовую группу, что приводит к сшивке адсорбированных молекул и к прикреплению их к носителю. В качестве аффинного лиганда к активированным носителям присоединяли гепарин. Полученные сорбенты оказались эффективны, например, при выделении бычьего антитромбина-III.

Пористые носители, содержащие алифатические ОН-группы, модифицированные прививкой полиакриламида в результате окислительно-восстановительного инициирования, оказались эффективны в распределительной хроматографии аминокислот [201].

Еще в 80-х годах прошлого века в компании Toyo Soda Manufacturing Co., Ltd (Япония) была разработана серия кремнеземных носителей TSK-GEL (например, сферические частицы размером 10 ± 2 мкм с диаметром пор 13, 24 и 45 нм). В работе [202] поверхность этих материалов активировали цианогенбромидом и в первом случае пришивали цефалоспорин, а во втором случае обрабатывали 1,6-гексаметилендиамином и пришивали остатки 7-пентааминоцефалоспориновой кислоты. Полученные материалы использовали в качестве гель-фильтрационных и анионообменных сорбентов для разделения белковых смесей. В той же компании разработан способ прививки виниловых мономеров на поверхность пористых материалов под действием μ - и γ -излучения [203]. Мономер (6–7 мономолекулярных слоев) адсорбировали на пористой матрице и облучали на источнике ^{60}Co . Оптимальная доза облучения (1-10 Мрад при $\sim 50^\circ\text{C}$) зависела от типа мономера.

В некоторых работах представлены способы, в которых перед полимеризацией на поверхность носителя адсорбировали мономер из паровой фазы. Так, в работе [204] на поверхность кремнезема в присутствии паров акриловой кислоты и винилацетата воздействовали ионизирующим излучением мощностью 40-100 рад/с. Затем активировали функциональные группы полученных привитых полимеров,

обрабатывая их бифункциональными реагентами (диаминами, диальдегидами, дихлорангидридами) с последующей иммобилизацией биополимеров (ферментов, нуклеотидов, уридина и т. п.). В результате удавалось вводить до 4 ммоль функциональных групп на 1 г сорбента, что, примерно, в 8 раз выше, чем для носителей, обработанных органосиланами.

В работе [205] приведены данные для ряда силикагелей, модифицированных поли-(2,3-эпоксипропилметакрилатом), которые свидетельствуют об однородном распределении привитого полимера на внутренней поверхности частиц носителя и об определяющем влиянии предварительной термической обработки исходного носителя на структуру привитого полимерного слоя.

В работах, описанных в уже процитированном обзоре [190], обращалось внимание на то, что при низких концентрациях адсорбированного на поверхности носителя мономера образуется система связанных с поверхностью кремнезема не взаимодействующих между собой макромолекул. При более высоких концентрациях адсорбированного мономера в формирующихся привитых макромолекулах снижается доля сегментов, связанных с поверхностью нековалентными связями, что, по-видимому, указывает на взаимное переплетение привитых цепей (как это имеет место при адсорбции полимера из раствора) [206].

Методами прививочной полимеризации удастся получать сорбенты с большим количеством привитой органической фазы (и с высокими молекулярными массами - до 10^6 и более) по сравнению с методами адсорбции полимеров [191]. Однако, при этом сложнее регулировать как величину молекулярной массы, так и количество адсорбированного мономера (во избежание закупорки пор в результате полимеризации).

Уже примерно три десятилетия при описании задач и результатов химического синтеза новых соединений исследователи используют термин «молекулярный дизайн» (различая при этом два основных направления - «структурно-ориентированный» и «функционально-ориентированный молекулярный дизайн»). Приведенные примеры композитов с привитой полимерной фазой, представленные в настоящем обзоре, подтверждают справедливость использования этого термина при рассмотрении деталей синтеза композитов на макромолекулярном уровне.

Приведенные примеры подтверждают, что для проведения эффективной прививочной полимеризации необходимо тщательно подбирать оптимальные условия, поскольку зависимость между условиями синтеза и характеристиками конечного продукта (как структурными, так и функциональными) в этом случае не столь

очевидна по сравнению с методами получения полимерных покрытий в результате физической адсорбции полимеров. В технологическом плане немаловажно, что прививочная полимеризация в присутствии носителя нередко включает большее число стадий, чем способы получения сорбентов в результате адсорбции полимеров на поверхности носителя.

1.5. Силаминированные кремнеземы как носители для получения полимерсодержащих композитов

Несколько слов необходимо сказать об использовании органосиланов в качестве низкомолекулярных модификаторов поверхности кремнезема, поскольку в настоящей работе получаемые в результате такого модифицирования кремнеземы использовали в качестве полупродуктов при получении некоторых типов сорбентов. Соответствующая информация, кратко резюмированная в данном подразделе, в основном, взята из руководства, написанного под редакцией Лисичкина [207].

Как правило, в качестве модификаторов используют органосиланы общей формулы R_nSiX_{4-n} ($n = 1 \div 3$), где X - гидролизуемая группа (галоген, алкокси- и пр.), а R - негидролизуемая группа, которая определяет сорбционные свойства получаемого материала.

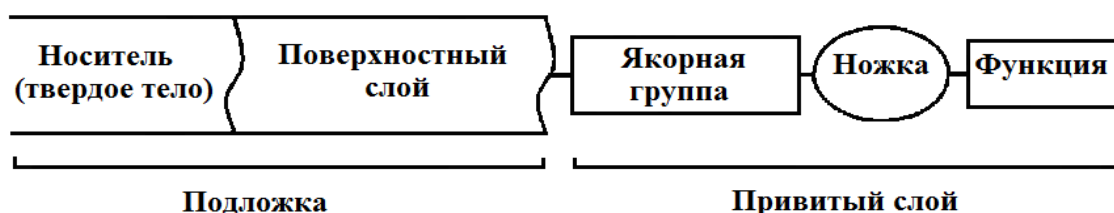


Рисунок 1.5 - Схема строения поверхностно-модифицированного материала [207].

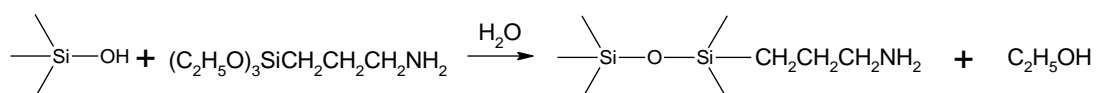
В любом привитом слое (как в мономолекулярном, так и в полимолекулярном) можно выделить три особых фрагмента (Рисунок 1.5). Во-первых, это - обобщенная функция, т. е. группа (или группы), определяющая основные свойства привитого соединения и, следовательно, свойства поверхности получаемого материала. Во-вторых, это - якорная группа, обеспечивающая химическое закрепление молекулы модификатора на поверхности носителя и отделяющая привитое соединение от поверхности носителя. В-третьих, это - «ножка» (или «линкер», «спейсер»), связывающая функциональную группу и якорь в единую молекулу. Иногда «ножка»

может отсутствовать (например, при использовании алкилсиланов AlkSiX_3 с целью получения гидрофобных покрытий якорная группа соединена непосредственно с функциональной группой).

В приведенных в предыдущем подразделе примерах было показано, что модифицирование силанами можно осуществить как из растворов, так и из газовой фазы.

Различают моно- (R_3SiX), би- (R_2SiX_2) и трифункциональные (RSiX_3) кремнийорганические модификаторы, реакционная способность которых возрастает с ростом числа активных атомов или групп (X) у атома кремния, что объясняется уменьшением стерических затруднений в реакции электрофильного замещения протона. По реакционной способности якорные группы с одинаковой функциональностью можно расположить в ряд: $\text{I} > \text{Br} \gg \text{Cl} > \text{OMe} > \text{OEt} \approx \text{OAc}$ [208].

В качестве примера можно привести схему прививки одного из наиболее распространенных модификаторов – γ -аминопропилтриэтоксисилана (АГМ-9, ГАПТЭС):



Получаемый в результате силаминированный кремнезем широко используется как сорбент, носитель для иммобилизации ферментов и катализаторов, а также как полупродукт для дальнейшего модифицирования. Традиционная методика прививки АГМ-9 на поверхность кремнезема предусматривает кипячение суспензии частиц носителя в абсолютном толуоле в инертной атмосфере в течение 24-36 ч, как описано, например, в [209, 210]. Необходимость в тщательной осушке растворителя и длительность процесса заставили исследователей разработать более эффективные методики. В этом отношении интересна работа [211], в которой сравнивается эффективность методов прививки силанов в толуоле, спирте, в водно-спиртовых смесях и в воде. Было показано, что силаминированные кремнеземы, полученные при кипячении суспензии частиц в воде в присутствии силана, по емкости и гидролитической стабильности не уступают или превосходят образцы, модифицированные в органических растворителях. Еще одним преимуществом модифицирования в водной среде является значительное сокращение времени процесса (до 30 мин). Перед дальнейшим использованием полученный материал достаточно промыть водой и при необходимости высушить.

1.6. Композиционные сорбенты, содержащие нетрадиционные полимерные фазы

Потребность в сорбентах с устойчивыми полимерными фазами, которые способны эффективно экранировать поверхность неорганического носителя, выдерживать воздействие агрессивных сред, частую смену подвижной фазы, подвергаться многократной регенерации без потери полезных свойств, стимулировала создание новых типов полимерсодержащих композитов, в первую очередь фторполимерсодержащих сорбентов. Эти сорбенты оказались полезны не только при разделении смесей низкомолекулярных соединений, но также и при выделении биомакромолекул. В первых подобных работах исследовали свойства химически модифицированных частиц полихлортрифторэтилена (ПХТФЭ, Kel-F) отличающихся гидрофобностью, высокой хемостойкостью и механической прочностью.

Частицы ПХТФЭ модифицировали металлоорганическими соединениями (такими как *n*-бутиллитий, ариллитий, алкилмагний и арилмагний). В результате в состав получаемых материалов были введены алькильные группы с уменьшенным содержанием хлора [212]. С помощью фенил-ПХТФЭ, полученного в среде ТГФ при трехкратном избытке металлоорганического компонента при комнатной температуре, удалось успешно разделить компоненты смесей ароматических, а также некоторых лекарственных веществ в водно-метанольной подвижной фазе в режиме обращено-фазовой хроматографии [213]. В результате модификации ароматического ядра в цепи фенил-ПХТФЭ удалось получить сильные катион- и анионообменники (с емкостью около 0.2 ммоль/г) [214]. Интересно отметить, что благодаря присутствию фторсодержащих групп эти ионообменники сочетали свойства обращенно-фазовых и ионообменных сорбентов. Они оказались эффективны при разделении близких по строению производных витаминов группы В, нитрофенолов и карбоновых кислот [215].

С целью разделения смесей, содержащих тРНК, ДНК-фрагменты, олигонуклеотиды или нуклеозиды, ПХТФЭ модифицировали триалкил (С8-С10) метиламмонием либо четвертичным аммониевым соединением RPC-5 [216-218]. Эти попытки не увенчались успехом, поскольку полученные материалы оказались непригодны для многократного использования в качестве насадки для ВЭЖХ-колонок.

Тем не менее, разработка новых способов получения композитов на основе пористых неорганических носителей, поверхностно модифицированных фторполимерсодержащими соединениями, в том числе полимерами, со временем

открыла возможности для создания эффективных протоколов очистки биологически активных веществ. Однако первые работы по исследованию сорбционных свойств таких композитов были посвящены взаимодействию фторсодержащих поверхностей с низкомолекулярными соединениями. Так, Берендсен [219] модифицировал силикагель (гептадекафтордецил)диметилсиланом (ГФД) и сравнил свойства полученного материала с кремнеземами, модифицированными пропил- и *n*-децил- аналогами. Оказалось, что ГФД-фаза хорошо удерживает фторсодержащие соединения, благодаря чему удалось разделить бензол и фторбензол, в то время как на аналогичных не содержащих фтор носителях эти вещества не разделялись. Удерживание фторсодержащих молекул усиливалось по мере увеличения числа атомов фтора в молекуле сорбата. По сравнению с C18-фазами ГФД-фаза удерживает ароматические соединения слабее. Этот эффект не является следствием укорочения углеродной цепи, поскольку было показано, что добавление в подвижную фазу трифторэтанола подавляло селективность ГФД-фазы к фторсоединениям, в то время как не содержащие фтор молекулы, такие как ацетофенон, на ГФД-фазе удерживались сильнее по сравнению с C18-фазой.

В некоторых работах (например, [220]) было показано, что носители с перфторированной полимерной фазой менее полярны, нежели сорбенты с C-18-фазой. Тем не менее, в первом случае наблюдали более выраженную селективность при разделении как фторсодержащих сорбатов, так и соединений, не содержащих атомы фтора. При исследовании свойств перфторэтоксигетанольной фазы было обнаружено, что полициклические ароматические углеводороды удерживаются благодаря индукционным взаимодействиям между C-F диполями и электронными структурами молекул сорбатов [221]. Близкие результаты были получены для силикагелей, модифицированных пентафторфенильными фазами, эффективно удерживающих нефторированные галогенсодержащие молекулы [222].

Важно упомянуть исследование, в котором изучали сорбцию предварительно фторированных биополимеров на фторированных полимерных матрицах. Авторы предположили, что удерживание перфторалкилсодержащего белка фторсодержащей углеродной поверхностью определяется особым «фтор-обусловленным» взаимодействием, механизм которого отличается от механизма обращенно-фазового разделения [223]. В работе [224] впервые описано об успешном разделении белковых смесей на фтормодифицированных носителях в режиме ВЭЖХ.

В работе [225] описан синтез и применение бифильного сорбента, полученного в результате модифицирования наружной поверхности частиц кремнезема остатками

перфторбутилэтилендиметилсилана (для уменьшения удерживания липофильных сорбатов, например, белков крови), с одновременным модифицированием внутренней поверхности пор октадецильными группами (для удерживания низкомолекулярных веществ). Этот сорбент использовали для определения содержания различных лекарственных соединений в крови.

Стоит заметить, что аналогичный принцип был положен в основу создания известных «сорбентов Пинкертона» [226], имеющих гидрофильную внешнюю поверхность (чтобы не удерживать молекулы лекарственных препаратов и пептидов, содержащихся в биологических жидкостях), и гидрофобизованную трипептидом глицинфенилаланинфенилаланила внутреннюю поверхность пор (до 98%). В результате из-за больших размеров молекулы белки не проникают внутрь пор, а низкомолекулярные метаболиты лекарственных веществ хроматографически разделяются во внутреннем объеме пористого сорбента. Автор этого исследования Пинкертона предложил набор терминов, описывающих полученные им носители: «внутренняя поверхность с обращенной фазой, экранированная гидрофобная фаза, полунепроницаемая поверхность, двухзонный материал, смешанные функциональные фазы».

Исключительная химическая стойкость фторполимеров обусловлена прочностью связей С-Ф. Концентрированные кислоты, щелочи, окислители и органические растворители не разрушают молекулы фторполимеров. Олеофобно-гидрофобная поверхность фторполимерных материалов отличается низкой поверхностной энергией. Поэтому такие поверхности слабо смачиваются органическими растворителями и водными растворами. В результате в определённых условиях на фторсодержащих поверхностях слабо адсорбируются как гидрофобные, так и гидрофильные молекулы, что позволяет эффективно разделять компоненты смесей биологических молекул, в частности, биополимеров, даже незначительно изменяя состав элюента. Дело в том, что при уменьшении числа точечных контактов с поверхностью сорбента облегчается десорбция макромолекул (повышается их сродство с подвижной фазой). Следует учесть еще одно важное свойство фторполимеров - их способность образовывать сплошные привитые однородные тонкие полимерные покрытия на твердых поверхностях, эффективно экранирующие поверхность носителя от воздействия агрессивных сред и обеспечивающие снижение неспецифической сорбции [227].

Высокая пластичность частиц фторполимеров не позволяет достичь высокой эффективности их применения при повышенных давлениях (например, при

проведении ВЭЖХ) и при интенсивном перемешивании (при реализации «batch-процессов»). Поэтому предполагалось, что фторполимерсодержащие композиты на основе кремнеземов будут сочетать контролируемую пористость и механическую прочность твердого носителя с хемостойкостью и специфическими сорбционными свойствами иммобилизованной полимерной фазы, экранирующей поверхность носителя (с целью минимизации неспецифической сорбции, обусловленной свойствами кремнеземной поверхности). Кроме того, такие сорбенты можно регенерировать и стерилизовать, повышая эффективность их применения в различных режимах хроматографии.

В научной литературе обсуждались различные подходы к модифицированию носителей фторполимерами с целью получения фторполимерсодержащих композитов. В ряде способов в качестве инициаторов полимеризации фтормономеров использовали озониды перфторолефинов, которые могут быть синтезированы путем низкотемпературного (77–280 К) озонлиза перфторолефинов при непосредственном взаимодействии с озоном при отсутствии растворителей. Получаемые продукты озонлиза стабильны (вплоть до температур 250–290 К) [228]. В работе [229] в качестве инициатора полимеризации использовали озонид димера гексафторпропилена (ДФФП), который наносили на поверхность носителя либо из паровой фазы, либо погружением носителя в жидкий озонид. При контакте с мономером озонид ДФФП инициирует полимеризацию в интервале температур 240–300 К. После удаления избытка озонида сначала в систему вводили мономер (например, тетрафторэтилен, винилфторид, метилметакрилат, акрилонитрил, ацетилен и др.), а затем систему нагревали до температуры распада озонида, вызывая полимеризацию мономера. Исходный ДФФП и его озонид стабильны и безопасны при хранении и транспортировке. Применение озонидов перфторолефинов позволило проводить полимеризацию в более мягких (266–323 К) условиях по сравнению с полимеризацией фтормономеров.

Основной целью ряда исследований (например [230]) являлось одновременное повышение адсорбционной емкости и понижение необратимой сорбции биополимеров на поверхности кремнезема. В упомянутой работе поставленная цель достигалась благодаря насыщению кремнеземной поверхности озоном (при низких температурах в течение 5 ч) с последующим введением в систему тетрафторэтилена (ТФЭ) и образованием привитого политетрафторэтиленового (ПТФЭ) покрытия при повышении температуры. Избыток озона предварительно удаляли при 200–400 К, поскольку при температуре < 200 К озон прочно сорбируется на кремнеземе, что при

введении мономера приводило к взрыву. Было показано, что в качестве носителей при обработке озонидами лучше всего подходят широкопористые материалы (с размером пор более 6 нм), такие как макропористые стёкла, силикагели и диатомиты. При использовании носителей с меньшим диаметром пор не удавалось получать равномерно распределенное по поверхности полимерное покрытие. С помощью полученных сорбентов обессоливали тРНК, очищали плазмидную ДНК от РНК и белков, разделяли смеси пептидов (А-цепь инсулина, брадикинин, В-цепь инсулина, лизоцим, нативный свиной инсулин), а также проводили разделение компонентов смеси жирорастворимых витаминов.

Были разработаны альтернативные способы синтеза композиционных фторполимерсодержащих сорбентов, основанные на проведении γ -инициированной пост-полимеризации виниловых мономеров (в частности, тетрафторэтилена) на поверхности пористых кремнезёмов. Подробное описание условий синтеза получаемых сорбентов, описание их свойств и областей применения обсуждались в диссертации Муйдинова [136]. В этом исследовании ТФЭ адсорбировали на поверхности пористого носителя, а затем подвергали воздействию ионизирующего излучения. В ходе изучения γ -инициированной полимеризации ТФЭ было установлено, что наиболее эффективно гомополимеризация мономера подавляется в процессе прививки полимера за счет стабилизированных на твердой подложке активных центров (при использовании пост-эффекта). В частности, было показано, что получение ПТФЭ-модифицированных кремнезёмных сорбентов можно осуществлять в различных режимах:

- облучением носителя при 300 К с последующим заполнением реактора ТФЭ вне зоны облучения и проведением пост-полимеризации в изотермических условиях («раздельный радиолиз» при комнатной температуре);
- облучением носителя при 300 К с последующим намораживанием мономера (ТФЭ) при 77 К и проведением пост-полимеризации в процессе разогрева;
- облучением носителя при 77 К с последующим намораживанием ТФЭ вне зоны облучения и проведением полимеризации в процессе размораживания («раздельный радиолиз» при температуре жидкого азота);
- совместным облучением носителя при 77 К с предварительно сорбированным при комнатной температуре ТФЭ и проведением пост-полимеризации при размораживании системы вне зоны облучения («совместный радиолиз» при температуре жидкого азота).

В результате сравнения свойств материалов, полученных в описанных выше

условиях, было найдено, что оптимальным способом получения ПТФЭ-содержащих сорбентов является совместный радиолиз, поскольку в этом случае ТФЭ сорбируется из газовой фазы равномерно по всей поверхности кремнезема, что способствует формированию равномерно нанесенного полимерного слоя. Тем не менее, в результате применения этого способа синтеза сорбентов не обеспечивалось отсутствие (или значительно уменьшение) неспецифического удерживания молекул сорбата на поверхности получаемых сорбентов, поскольку растущие радикалы на концах цепей прививаемого ПТФЭ на воздухе образуют кислородсодержащие полярные группы, в дальнейшем способствующие сорбции биомолекул. Для решения этой проблемы проводили т. н. «эндкэппинг» концевых полярных групп различными соединениями, например, гесафторпропиленом. Полученные в результате проведения такой обработки материалы использовали в качестве сорбентов для обращено-фазовой и эксклюзионной хроматографии биополимеров, а также в медицине в качестве гемосорбентов [231-233]. Тем не менее, применение таких материалов ограничено сложностью технологии их получения (необходимость в источнике радиации, в криотехнике и т. д.).

Сорбционное поведение фторполимерсодержащих материалов значительно отличает их от других известных полимерсодержащих сорбентов. Это отличие впервые продемонстрировано в 1978-80 г.г. в работах [234, 235] Иэртена, в которых исследованы сорбционные свойства ПТФЭ в отношении смесей биополимеров. Было показано, что перфторполимеры обладают уникальной способностью обратимо сорбировать белки и пептиды, но при этом не удерживать (или слабо удерживать) НК.

Разработка композитов на основе неорганических матриц, модифицированных фторсодержащими соединениями, открыла новые перспективы в области выделения и очистки биологически активных соединений.

Потребность в биосовместимых сорбентах, сочетающих механическую прочность и контролируемую пористость исходного носителя с высокой селективностью иммобилизованной на поверхности сплошной фазы, стимулировала разработку методов синтеза композиционных фторполимерсодержащих материалов. В результате были созданы сорбенты, эффективность применения которых подтверждена многочисленными исследованиями по разделению смесей биологически активных соединений, в частности, биополимеров.

Важнейшее хроматографическое свойство фторполимерсодержащих сорбентов не удерживать ДНК и обратимо удерживать белки экспериментально продемонстрировано в исследовании [134] и обсуждалось в обзоре [236] на примере

использования ПТФЭ-кремнезема, полученного методом радиационной пост-полимеризации, с целью выделения плазмидной ДНК. Через колонку с сорбентом пропускали раствор плазмиды рBR322, содержащий также РНК и белки, в нейтральном буфере (рН 7.5–8.2). РНК и белки оставались на колонке, а плазида выходила в составе исключенного объема (Рисунок 1.6).

РНК элюировали с колонки 10% пропанолом (либо метанолом или ацетонитрилом). При повышении доли органического растворителя в составе элюента до 50% удавалось полностью элюировать белковую фракцию. В работе [134] приведен ряд примеров разделения смесей биополимеров на ПТФЭ-содержащих сорбентах, в частности, результат разделения смеси, содержащей α -интерферон и НК при градиентном элюировании ацетонитрилом в 7М мочеvine.

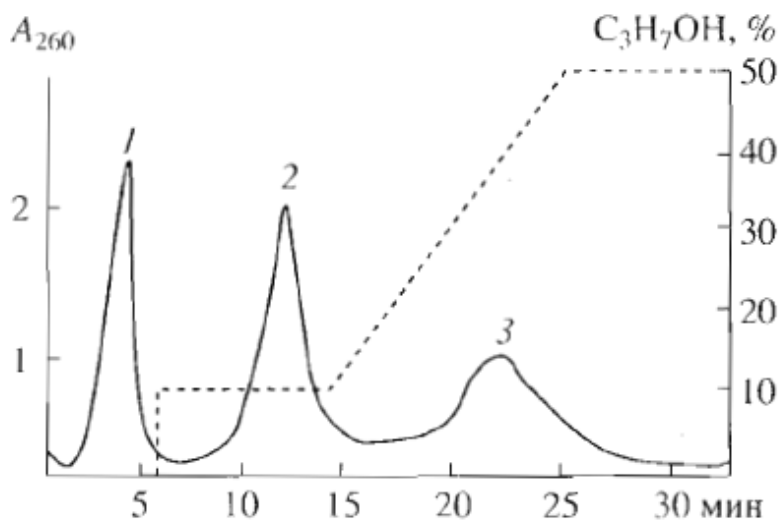


Рисунок 1.6 - Очистка плазмиды рBR322 от РНК и сопутствующих белков. Использовали колонку, упакованную МПС-2000ГХ-ПТФЭ. Элюент: 0.01М Tris-HCl (рН 7.5-8.2). Градиент: 0–50% изопропанола за 25 мин. Скорость потока: 100 мкл/мин. 1 – плазида, 2 – РНК, 3 – белки [134].

Известно исследование [135], посвященное получению и исследованию свойств кремнеземных сорбентов, покрытых нанослоями частично фторированных полимеров, в частности, политрифторстирола (ПТФС). В работе описаны альтернативные способы получения фторполимерсодержащих сорбентов, основанные на использовании сополимера трифторстирола (ТФС) и метилвинилдиэтоксисилана, синтезированного радикальной сополимеризацией. По первому способу частицы силикагеля обрабатывали раствором сополимера в абсолютном толуоле. Остаточные силанольные группы сорбента обрабатывали гексаметилдисиланом. По второму способу ампулу с силикагелем, предварительно модифицированным ПТФЭ, вакуумировали и охлаждали до 77 К. После этого облучали полученную систему с

помощью γ -источника дозой 3-5 Мрад. Затем ампулу медленно нагревали до 333 К, в систему вводили пары ТФС, систему выдерживали 18 ч. Полученный сорбент отмывали от димера ТФС. Оба полученных сорбента имели близкие сорбционные свойства и по своим характеристикам занимали промежуточное положение между кремнеземами, модифицированными ПТФЭ и полистирольными сорбентами. Материал, полученный путем γ -инициированной пост-полимеризации, отличался более высокой стойкостью к гидролизу. На полученных сорбентах в обращено-фазовом режиме хроматографии разделяли компоненты смесей белков, пептидов и антибиотиков (преимущественно пептидной природы). Кроме того, с их помощью удалось разделять смеси веществ пептидной и гликопептидной природы различной молекулярной массы – от нескольких сотен (эндорфин, брадикинин) - до десятков тысяч дальтон (БСА), а также смеси пептидов и белков близкой молекулярной массы, например, компоненты пчелиного яда.

Параметры удерживания белков и пептидов ПТФС-кремнеземами подтвердили гидрофобный механизм удерживания, характерный для традиционных обращенных фаз типа C_8 – C_{18} . На основе синтезированных материалов также получали ионообменники различной емкости, с помощью которых разделяли, например, человеческий инсулин и дезамидоинсулин (на катионообменнике), а также нуклеотиды (моно-, ди- и трифосфаты аденизина – на анионообменнике).

Очевидно, что благодаря хемостойкости и высокой селективности к соединениям различных классов, фторполимерсодержащие сорбенты весьма эффективны при проведении различных вариантов ВЭЖХ биополимеров. Широкое применение известных фторполимерсодержащих сорбентов ограничивается сложностью и трудоемкостью методов их получения. Поэтому необходимо разрабатывать новые способы иммобилизации сплошных равномерно распределенных по поверхности твердых носителей фторполимерных слоев, а также альтернативные не содержащие фтор полимерные модификаторы, входящие в состав композитов для выделения и очистки биополимеров.

Одним из таких модификаторов мог бы стать открытый еще в 1947 г. поли-*n*-ксилилен, известный также как парилен N (незамещенный поли-*n*-ксилилен) [237, 238]. Париленовые покрытия впервые были применены для защиты электронных устройств в 1965 г. компанией Union Carbide Corp. (США), которая и дала соответствующим полимерам общее название «парилены». В зависимости от типа заместителя в ароматическом кольце (или в метиленовой группе) получают различные замещенные парилены, в том числе, поли- α, α', α' -тетрафтор-*n*-ксилилен (парилен AF-

4), образующий стойкие биологически инертные покрытия на твердых поверхностях медицинских изделий [239, 240].

Поли-*n*-ксилиленсодержащий кремнеземный сорбент (точнее, модифицированный незамещенным париленом N), полученный в работе [241], служит примером композита с нанопокрывтием на основе не содержащего фтор полимерного модификатора. Исходный мономер *n*-ксилилен ($\text{CH}_2=\text{C}_6\text{H}_4=\text{CH}_2$) в обычных условиях существует в виде циклического димера, который переходит в газообразное мономерное состояние при пиролизе (около 600°C). В этих условиях в присутствии носителя с развитой поверхностью мономер интенсивно полимеризуется на его поверхности с образованием сплошного полимерного покрытия (толщиной 25-50 Å). Получаемый материал устойчив в условиях щелочного гидролиза, пористость исходного носителя в значительной мере сохраняется. Описанный в [241] метод предполагает возможность введения различных заместителей в состав полимерного покрытия с целью получения сорбентов с заданными свойствами. Интересны работы, в которых доказана био- и гемосовместимость медицинских изделий, покрытых слоями хлорзамещенного поли-*n*-ксилилена. Например, в работе [242] описан имплантируемый сенсор кровяного давления, рабочая поверхность которого покрыта двойным слоем парилена С (хлор-монозамещенный в бензольном кольце поли-*n*-ксилилен). В этом исследовании показано, что на париленовой поверхности увеличивается сорбция белков плазмы и одновременно максимально снижается адгезия тромбоцитов. В другой работе [243] предлагаются многоразовые (пригодные, как минимум, для 10 последовательных применений) мембраны на основе парилена С, используемые в устройствах для *in vitro* диагностики с нанесением на поверхность мембраны белков и/или клеток.

Тем не менее, в научной литературе отсутствуют данные о получении и применении париленсодержащих сорбентов (как с использованием парилена N, так и замещенных париленов) для выделения/очистки биополимеров. По-видимому, это связано не столько с необходимостью использования довольно сложной в технологическом отношении пиролитической установки для синтеза таких сорбентов, сколько с весьма широким предложением готовых париленсодержащих материалов (и соответствующих технологий), предлагаемых коммерческими компаниями, в основном, для нужд электроники или хирургической имплантации.

Представленный обзор научной литературы позволяет сделать важный и отчасти неожиданный вывод о том, что как известные ранее, так и разрабатываемые в последнее время композиционные сорбенты и системы пробоподготовки практически

не используются (очевидно, в силу своих физико-химических свойств) с целью реализации эффекта «негативной селекции» в отношении НК, что серьезно усложняет любые варианты пробоподготовки биологических образцов с использованием таких сорбентов. Исключения составляют немногочисленные и дорогостоящие перфторполимерсодержащие материалы.

Главу 1 нельзя считать завершенной, не рассмотрев возможности, которые дает использование полианилина (ПАНИ) - полимерного модификатора, весьма перспективного для синтеза полимерсодержащих композитов. Ввиду уникальности свойств ПАНИ, особенностей процесса его получения и свойств покрытий, получаемых в результате полимеризации анилина в присутствии твердых носителей, обзор литературы, посвященный этим вопросам, выделен в отдельный подраздел.

1.7. Полианилин как модификатор поверхности при получении композиционных материалов

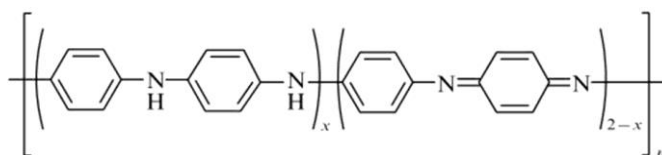
Полианилин (ПАНИ) в качестве полимерного модификатора при получении новых композиционных сорбентов выбран автором неслучайно. ПАНИ относится к классу особых макромолекул с системой полисопряжения, обладающих высокой химической стойкостью и уникальными сорбционными свойствами, которые можно обратимо изменять в результате допирования-раздопирования. Благодаря рН-чувствительности, ПАНИ относят к *smart*-полимерам («стимул-чувствительным» полимерам), что определяет широкий спектр применений ПАНИ в различных областях науки и техники, например, в качестве покрытия катодов в литиевых аккумуляторах [244], при получении электрохимических конденсаторов [245, 246] и топливных элементов [247], при производстве газоразделительных, первапорационных и ионселективных мембран [248-250], антистатических покрытий [251], а также при получении материалов, защищающих от СВЧ-излучения [252]. ПАНИ эффективен в качестве ингибитора коррозии металлов [253], как сокатализатор или заменитель металлических катализаторов при гетерогенном катализе [254, 255], как компонент электрохромных устройств, управляющих интенсивностью пропускания света [256, 257], в качестве сорбента для очистки сточных вод [258], в робототехнике [259], в полимерной литографии [260] и др. Перспективные направления использования ПАНИ связаны с получением селективных сенсоров (называемых «электронный язык» или «электронный нос»), предназначенных для определения газов, паров, ионов, наркотических веществ, аминокислот [261-263], а

также материалов для иммобилизации ферментов [264], регенерации тканей [265, 266], извлечения вирусов из различных сред [267, 268] и т. д.

В 1834 г. Рунге впервые описал окрашенный продукт окисления анилина (позже названный эмеральдином) [269], а в 1840 г. Фритцше (Fritzche) получил форму ПАНИ, названную им «анилиновым черным» [263, 270], который позже начали использовать для окрашивания тканей из хлопка. Изначально черный анилин рассматривали как анилиновый октамер в различных окисленных состояниях [271]. Позднее было показано, что окисление анилина при определенных условиях приводит к получению полимера. Грин и Вудхэд предложили описывать структуру ПАНИ в трех базовых формах, которые используются по сей день [272]. В 60-е г.г. XX в. ПАНИ активно исследуют в качестве электропроводящего полимера, и интерес к его изучению возрастает [273, 274], особенно после того, как в 1977 г. был синтезирован допированный полиацетилен с электропроводностью до 10^5 См/см (сопоставимой с электропроводностью металлов) [275]. С этого момента ПАНИ включают в группу т. н. «синтетических металлов».

1.7.1. Структура ПАНИ и механизм окислительной полимеризации анилина

Термином «полианилин» обозначают полимеры, состоящие из чередующихся аминифенильных и хиноидиминных фрагментов (причем общее число звеньев в макромолекуле может превышать 1000). Структура таких полимеров отвечает формуле:



[276-278].

Таким образом, макромолекула ПАНИ включает фрагменты, относительное число которых определяется уровнем окисления цепи, поскольку ПАНИ может обратимо окисляться и восстанавливаться. В зависимости от уровня окисления различают три основные формы ПАНИ: $x = 0$ - пернигранилин - полностью окисленная форма; $x = 2$ - лейкоэмеральдин - полностью восстановленная форма; $x = 1$ - эмеральдин - форма с соотношением окисленных и восстановленных фрагментов, равным 1:1 [278].

Каждая форма ПАНИ может вступать в кислотно-основные реакции и существовать как в виде соли, так и в виде основания [279,280]. Схема кислотно-основных и окислительно-восстановительных переходов между формами ПАНИ представлена на Рисунке 1.7 [263,281].

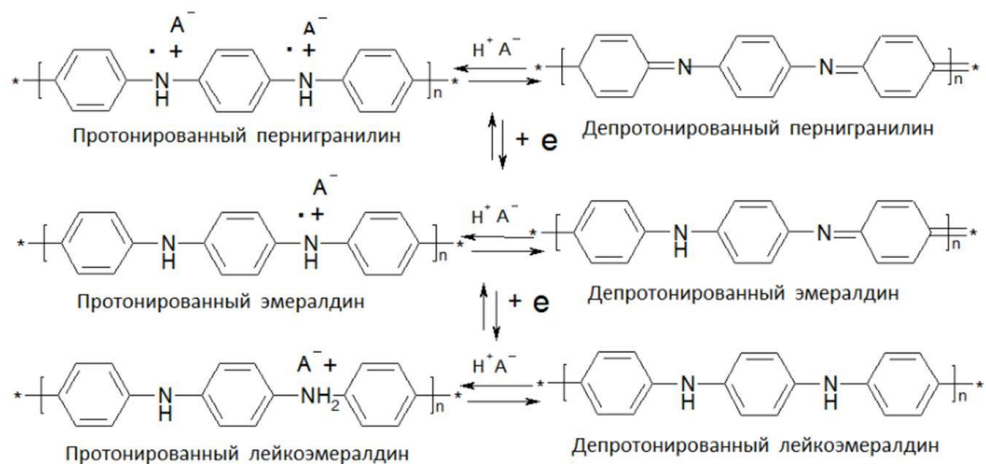


Рисунок 1.7 - Формы ПАНИ и переходы между ними [263, 281].

Протонированный эмеральдин (например, гидрохлорид эмеральдина), в цепи которого содержится равное количество окисленных и восстановленных звеньев, является наиболее устойчивой формой ПАНИ [263].

Чаще всего ПАНИ получают в результате химической или электрохимической окислительной полимеризации анилина [282]. Способы электрохимического синтеза ПАНИ основаны на окислении анилина в кислой среде под действием приложенного постоянного потенциала (потенциостатический метод [283]) или развертки потенциалов (потенциодинамический метод [284]), когда беспримесный полимер образуется непосредственно на поверхности электрода. Толщину полимерного слоя регулируют, изменяя величину заряда, протекающего через реакцию систему.

Технологически проще осуществлять и масштабировать процессы химического синтеза ПАНИ. К этой группе процессов относятся, в основном, способы получения ПАНИ, основанные на полимеризации анилина под действием окислителей. На структуру и свойства конечного продукта влияют природа окислителя и кислоты-допанта, соотношение мономер:допант:окислитель, а также pH реакционной среды [285]. Весьма редко ПАНИ получают поликонденсацией, используя функционализированные анилины, содержащие реакционноспособные заместители, по схеме: $(Y-An-X = (-An-)_n + XY)$ [263].

Полимеризацию анилина принято относить к классу цепных реакций, поскольку при синтезе ПАНИ мономерные звенья последовательно достраивают полимерную цепь с активной концевой группой, что подтверждено исследованиями молекулярно-массового распределения в процессе синтеза. В частности, было показано, что мономер сосуществует с полимерной фракцией, а содержание олигомеров минимально [286]. В работах [263, 285-287] полимеризация анилина рассматривается как реактивируемая цепная реакция, в которой рост цепи сопровождается повторяющимися актами активации-деактивации структуры. Окислитель активирует макромолекулу, которая, присоединяя мономерное звено, снова обратимо дезактивируется. Если при радикальной полимеризации окислитель участвует только в формировании первичного радикала (при использовании окислителя в качестве инициатора), то в окислительной полимеризации окислитель требуется на протяжении всего процесса (участвуя в редокс-взаимодействиях вплоть до присоединения последней порции мономера) [263, 286].

В реакции синтеза ПАНИ можно выделить, по крайней мере, две стадии: индукционный период (когда не наблюдается окрашивание реакционной смеси и образование твердой фазы полимера) и стадию роста цепи, во время которой скорость образования полимера растет, а затем снижается до нуля, в результате чего кинетическая кривая реакции окислительной полимеризации анилина приобретает S-образный вид [138]. В работе [278] было сделано предположение, что на первой стадии в результате окисления анилина образуются олигомеры пернигранилина, которые на второй стадии реагируют между собой с образованием полимера (эмеральдиновой соли). Другие исследователи [288, 289], полагали что ПАНИ образуется в результате цепной реакции рекомбинации катион-радикала концевое полимерного звена и катион-радикала мономера. Однако такой процесс с низкой энергией активации характеризуется низкой селективностью, в результате чего образуется смесь различных структур (что справедливо для широкого круга мономеров). Напротив, в случае анилина полимеризация высокоселективна, и при росте цепи воспроизводится только *para*-структура мономерных звеньев [263].

Обычно как для описания электрохимического, так и химического синтеза ПАНИ предлагают схему, представленную на Рисунке 1.8. На первой стадии полимеризации анилина (индукционный период) образуются реакционные частицы полимеризации – анилиновые катион-радикалы [286, 290], которые связываются по типу электрофильного замещения до димера (N-фенил-1,4-фенилендиамина – *n*-семидина) [286]. Рост цепи происходит в результате электрофильного замещения

после атаки окисленной концевой аминогруппы в *para*-положение молекулы мономера. В окислении участвует наиболее реакционноспособная депротонированная форма мономера [291]. Скорость окисления лимитируется образованием катион-радикалов мономера или процессом образования димеров [292].

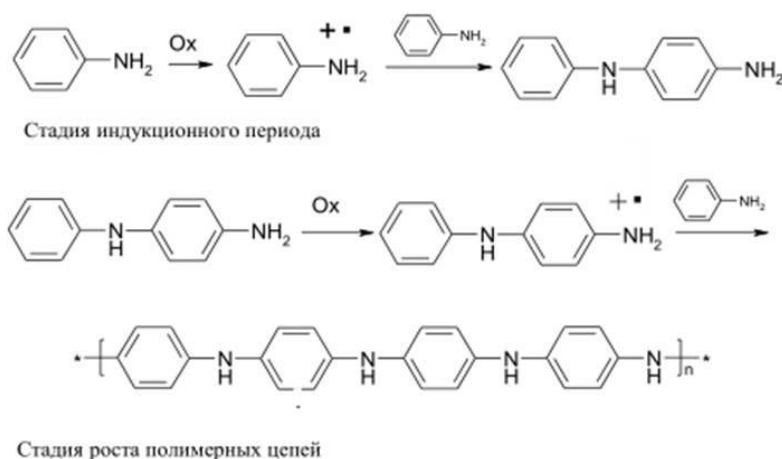


Рисунок 1.8 - Окислительная полимеризация анилина путем электрофильного замещения [263].

Предлагаемая схема не позволяет объяснить ряд особенностей, наблюдаемых при синтезе ПАНИ. Например, не ясна причина немонотонности окисления в кислой среде, проявляющаяся в заметном расхождении значений констант скорости роста на первой и второй стадиях; не ясно, почему окислительный потенциал в начале реакции полимеризации повышается до + 1.05 В, а затем резко понижается до + 0.7–0.8 В на стадии роста. Схема не объясняет, почему в ходе роста полимерной цепи воспроизводится исключительно *para*-структура мономерных звеньев. Кроме того, трудно объяснить автокаталитический и гетерофазный характер процесса, влияние типа поверхности внесенного в систему твердого носителя на кинетику полимеризации [263].

Интересно отметить, что в некоторых работах указывалось на высокую вероятность неравномерного распределения окисленных и восстановленных фрагментов вдоль макромолекулы ПАНИ, в отличие от устоявшегося представления о структуре ПАНИ, содержащей чередующиеся аминные и иминные звенья [282, 293–295]. Для обоснования такого заключения авторы [293–295] изучали фотолюминесценцию образцов ПАНИ, а также провели комплексное исследование этих образцов с применением дифференциальной циклической вольтабсорптометрии, оптической и рентгеновской электронной спектроскопии, атомно-силовой и кельвин-

зондовой силовой микроскопии, что указало на присутствие в образцах участков с различной проводимостью. По результатам этого исследования авторы ввели в научный обиход новый термин «редокс-гетерогенность», а также предложили модель эмеральдина, содержащую последовательность аминных, хинониминных и смешанных блоков различной длины [282, 293-295]. Как будет показано ниже, такая гетерогенность обусловлена сложностью механизма образования ПАНИ и приводит к формированию разнообразных полимерных структур.

Экспериментально обоснованный механизм синтеза ПАНИ, объясняющий формирование регулярной *para*-структуры макромолекул ПАНИ и описывающий многообразие продуктов окисления анилина, получаемых в различных условиях, предложен в работах Сапуриной с сотр. [263, 281, 296, 297].

Экзотермический характер реакции окисления анилина предполагает, что на стадии индукционного периода образуется *n*-семидин (т. е. димер анилина - *N*-фенил-1,4-фенилендиамин), молекулы которого выступают в качестве активных «центров инициации» роста цепи ПАНИ (Рисунок 1.8) [298]. Образование *n*-семидина было подтверждено данными о присоединении катион-радикала анилина в *n*-положение в макромолекуле ПАНИ [298], что, однако, не укладывается в общую теорию полимеризации, поскольку не объясняет кинетику образования димера [263]. При окислении анилина одновременно образуются линейные олигомеры и гетероциклы феназинового типа (Рисунок 1.9) [298]. Некоторые авторы предполагали, что циклизация является пост-полимеризационным процессом [299, 300], в то время как другие группы исследователей экспериментально подтверждали образование феназиновых циклов на ранних стадиях окисления анилина [301, 302].

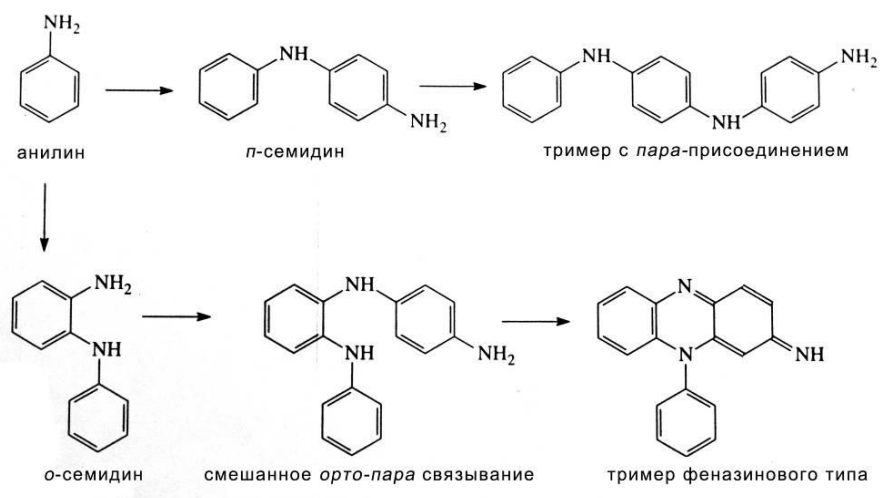


Рисунок 1.9 - Олигомеры анилина. Схема взята из [298], подписи переведены на русский язык.

В работах [263, 296], сформулированы принципы, положенные в основу молекулярного механизма окисления анилина.

1. Центрами инициирования полимеризации являются образующиеся на стадии индукционного периода низкомолекулярные линейные олигомеры (производные *n*-семидина) и гетероциклы (феназин-содержащие олигомеры). Цепь ПАНИ формируется за счет присоединения феназиновых фрагментов к линейным структурам (Рисунок 1.10) [296].

2. В зависимости от pH реакционной среды амино- и иминогруппы в молекулах мономера, олигомеров и полимера имеют различные заряды, что определяет неодинаковую реакционную способность протонированных и непотонированных частей макромолекулы ПАНИ и приводит к образованию различных продуктов окисления анилина. Двухстадийность полимеризации и переход реакции из гомогенного процесса в гетерофазный связаны с образованием феназина, а ПАНИ формируется не в виде индивидуальных цепей, а как наноструктура [263].

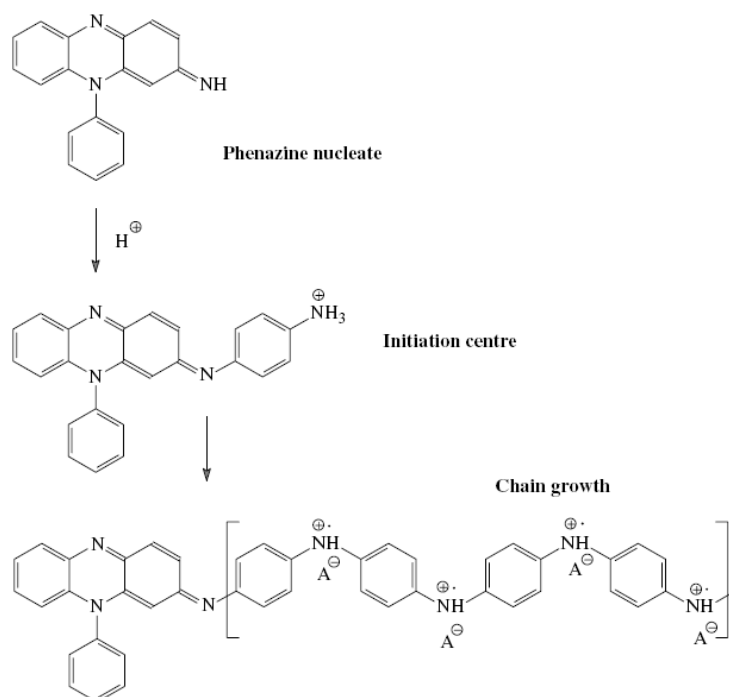


Рисунок 1.10 - Процесс окисления анилина и рост цепей ПАНИ. A^- – противоион, обусловленный присутствием допанта (кислоты) [296].

В исследовании Сапуриной [263] также установлено, что при $pH > 3.6$ формируются непроводящие олигомеры анилина с разнородной структурой цепей. В диапазоне $pH 3.6-2.5$ образуются низшие циклические олигомеры анилина (мономер находится в протонированной форме, а полимерная цепь непотонирована; окисление подавлено). При $pH < 2.5$ (мономер и цепь протонированы) образуются регулярные

полисопряженные цепи электропроводящего ПАНИ в результате двухстадийного процесса (что является общепринятым утверждением). Показано, что при переходе из одного диапазона рН в другой свойства образующихся продуктов резко изменяются. Формирование регулярной *n*-замещенной структуры ПАНИ в сильноокислых средах обусловлено региоселективностью внутримолекулярной перегруппировки (благодаря выигрышу энергии полисопряжения) [263].

Таким образом, сложность механизма полимеризации анилина и условия проведения реакции определяют образование разнообразных по химической структуре и морфологии полимерных продуктов. Можно ожидать, что сорбционные свойства материалов, модифицированных ПАНИ, также будут в значительной степени определяться условиями их получения. В следующем подразделе диссертации рассмотрены работы, в которых исследовались особенности полимеризации анилина в присутствии твердых носителей.

1.7.2. Полимеризация анилина в присутствии твердых подложек

Надмолекулярные структуры, получаемые в результате полимеризации анилина, отличаются большим разнообразием. В ряде экспериментальных работ и обзоров [303-305, 263] подробно рассмотрены условия их получения, особенности морфологии и возможные применения. Различают одномерные структуры (такие как нановолокна, нанопалочки и нанотрубки), двумерные (включающие т. н. листочки, ленты и доски), а также трехмерные структуры (гранулы, нано- и микросферы) [263]. Эти структуры могут быть получены индивидуально, а также могут формировать более сложные образования, которые состоят из волокон: волокна могут быть уложены в пачки [306], могут исходить из единого центра или оси, создавать сетки и дендриты [263]. Волокна могут образовывать двумерные так называемые «микроматы» [307] - частицы ромбовидной формы, «сплетенные» в виде циновки из нескольких слоев волокон. Среди трехмерных структур выделяют микрошары [263] и полые микросферы [308].

В работе [309] показано, что на начальном этапе реакции происходит межмолекулярное связывание феназиновых частиц в колонны за счет π - π электронного взаимодействия ароматических циклов. Наиболее энергетически выгодна самосборка феназиновых циклов в регулярные структуры, но в определенных условиях образуются хаотические агломераты сферической формы. По мнению Сапуриной с сотр., «...регулярные (одномерные, плоские) и хаотический типы

агломерации феназиновых циклов, протекающих в зависимости от условий реакции, создают различные типы заготовок, на которых затем растут полимерные цепи...» [263].

Крайне важно отметить, что все типы надмолекулярных структур ПАНИ могут формироваться не только в объеме реакционной среды, но и на разнообразных поверхностях раздела фаз [310-312]. ПАНИ-покрытия, как правило, однородны по толщине и прочно удерживаются носителем.

Процесс формирования надмолекулярных структур ПАНИ определяется рН реакционной среды и окислительным потенциалом окислителя. В щелочных средах происходит агрегация цепочек образующихся олигомеров и их выпадение в виде осадка аморфных структур, либо образование неоднородных покрытий, слабо удерживаемых поверхностью носителя, либо формирование микро- и наносфер (в последнем случае при подкислении раствора остается только оболочка, что позволяет получать полые сферы [308]).

В слабокислых средах могут быть получены как двумерные и одномерные продукты («доски», «ленты», волокна или палочки), так и более сложные структуры: «микроматы» и «ежи» (состоящие из волокон), «цветы» (состоящие из плоских элементов) и др. [263] (Рисунок 1.11).

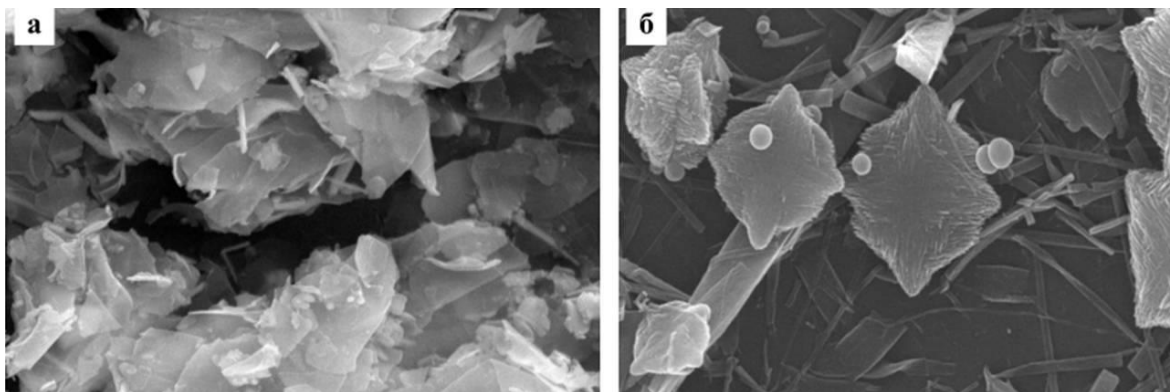


Рисунок 1.11 - Двумерные структуры ПАНИ: «доски» (а), «ленты» и «микроматы» (б), сформировавшиеся в нейтральной и слабокислой средах. РЭМ [263].

В диапазоне $3.5 > \text{pH} > 2.5$ практически все олигомеры представляет собой водонерастворимые феназины, которые самоорганизуются в частицы определенной геометрической формы с высокой степенью кристалличности [313].

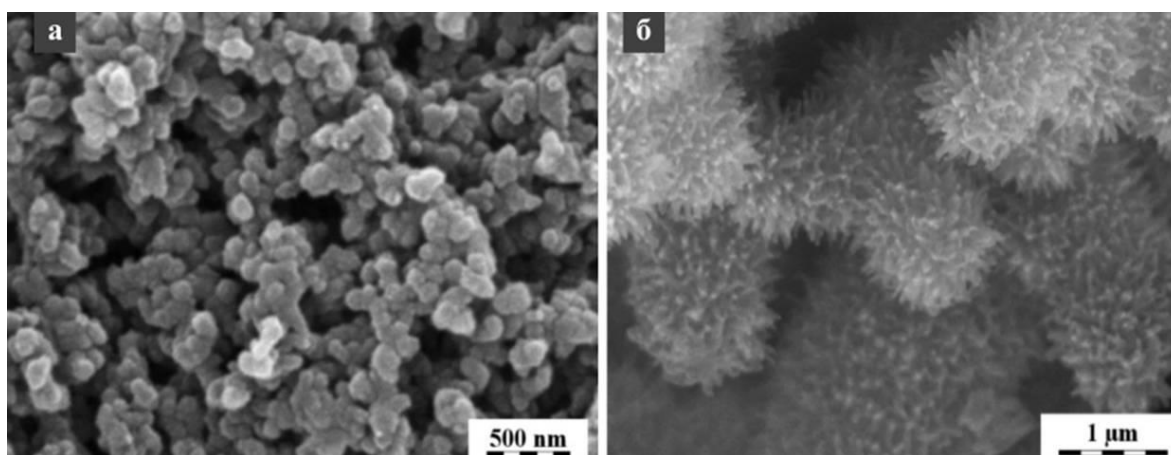


Рисунок 1.12 - Структуры ПАНИ, полученные в сильноокислой среде: (а) – под действием сильного окислителя (гранулярная трехмерная структура); (б) - под действием слабого окислителя (структура из одномерных волокон). РЭМ [263].

При проведении реакции в условиях $\text{pH} < 2.5$ и при использовании слабых окислителей продолжительный индукционный период благоприятствует росту одномерных структур, в то время как короткий индукционный период при использовании сильных окислителей приводит к образованию сферических частиц ПАНИ, образующих исключительно стабильные продукты гранулярной морфологии (Рисунок 1.12) [263].

Не рассматривая варианты проведения реакции полимеризации анилина с целью получения ПАНИ-структур на границе раздела жидких фаз, кратко остановимся на способах получения ПАНИ-покрытий на твердых носителях. Описанные в литературе методы получения композиционных ПАНИ-содержащих материалов можно отнести к четырем основным типам.

1. Методы химического поверхностного осаждения и химического диффузионного осаждения обеспечивают однородное распределение ПАНИ в композите [314].

2. Образование пленок на поверхности носителя с использованием дисперсий ПАНИ-частиц (в этих случаях структура и свойства получаемых покрытий зависят от растворимости ПАНИ) [315, 316].

3. Получение покрытий электрохимическим осаждением. Как правило, в этих случаях площадь покрытия определяется параметрами электрохимической ячейки (либо поверхностью электрода) [285].

4. Метод механического перемешивания (используется для получения ПАНИ-содержащих композитов на основе некоторых редких оксидов металлов) [317].

Все же, когда речь идет о получении ПАНИ-содержащих композитов, наиболее технологичными представляются методы, отнесенные к первой группе. Исследованию процессов образования ПАНИ-покрытий в ходе окислительной полимеризации анилина *in situ* в присутствии внесенного субстрата посвящен ряд работ. ПАНИ можно легко высадить из смеси водных растворов анилина в присутствии допанта (кислоты) и окислителя в виде хорошо удерживающейся пленки на поверхности различных материалов в результате так называемой адсорбционной полимеризации [314, 316]. С этой целью носитель погружают в указанную смесь. Скорость образования покрытия и его характеристики зависят от ряда факторов: соотношения реагентов, концентрации, температуры и др.

Цзоу и Грегори [318] одними из первых показали, что скорость окислительной полимеризации анилина, как правило, увеличивается в присутствии твердого субстрата (носителя), однако при этом важно учитывать природу носителя. Так, по мнению авторов, на инертной поверхности рост ПАНИ-покрытия обусловлен осаждением частиц ПАНИ, образующихся в объеме реакционной смеси. В случае носителей, активных в реакции окисления, наблюдали заметное сокращение индукционного периода. Увеличение скорости реакции и уменьшение индукционного периода были пропорциональны площади поверхности субстрата (т. е. площади контакта осаждаемого ПАНИ с раствором).

В работе [319] методом осаждения получали ПАНИ-покрытия на различных (неорганических и органических) гладких твердых подложках. Толщину пленки регулировали, изменяя продолжительность погружения носителя в реакционную смесь. Максимальная толщина (около 30 нм) была получена при погружении на 5 мин и мольном соотношении окислитель:мономер, равном 1:2.

В работе [320] сообщалось о возможности нанесения покрытий ПАНИ на поверхность пленок из пористого кремния n^+ -типа. Методом рентгеновской спектроскопии показано, что структура полимера внутри пор не отличается от структуры полимера на поверхности кремния. Оказалось, что полимерное покрытие, состоящее из 5 монослоев ПАНИ, покрывает всю поверхность пор, в то время как покрытие на внешней поверхности носителя состоит из 2 монослоев (кроме того, происходит частичное окисление поверхности кремния).

Орлов с сотр. [321, 322] показали, что по мере увеличения концентрации исходных реагентов, взятых в реакцию, в водных средах происходит повышение

скорости полимеризации анилина и сокращение индукционного периода. Авторы отмечали сложный характер кривой зависимости от времени выхода ПАНИ, образующегося на поверхности субстрата. Кривая имела три четко различимых участка (А, В и С). Участок А соответствовал индукционному периоду. В присутствии субстрата участок В (который соответствует адсорбционной полимеризации) совпадал по времени с началом и завершением полимеризации анилина в объеме (т. е. в отсутствие субстрата). Кинетические различия сильнее всего проявлялись при низких концентрациях мономера (0.02-0.10 М). При объемной полимеризации отмечали меньшую скорость и больший индукционный период по сравнению с адсорбционной полимеризацией. При увеличении концентрации анилина до 0.2 М кинетические кривые объемной и пограничной полимеризации становились менее различимы.

Принимая во внимание, что «...основная масса высокомолекулярного полианилина образуется на поверхности субстрата - по границе раздела фаз, за то время, пока полимеризация в объеме реакционного раствора еще не началась.»..., авторы особо выделили этот процесс, назвав его «пограничной полимеризацией анилина» в отличие от адсорбционной полимеризации [321].

В этой же работе был сделан вывод, что на поверхности субстрата в начале окислительной полимеризации образуются низкомолекулярные «затравки», на которых затем формируется высокомолекулярный ПАНИ (т. е. не происходит адсорбция уже образовавшегося в результате объемной полимеризации ПАНИ на поверхности субстрата). При этом структуры ПАНИ, образующегося при пограничной и объемной полимеризации, существенно различаются, из чего авторами было сделано заключение, что процесс пограничной полимеризации не только кинетически, но и химически не зависит от хода объемной полимеризации анилина. Еще одно важное наблюдение состояло в том, что при адсорбционной полимеризации анилина на завершающей стадии процесса происходит деструкция ПАНИ-покрытия, что соответствовало появлению участка С на кинетической кривой.

Исследование [321] завершается выводом о том, что при полимеризации анилина в присутствии субстрата независимо друг от друга протекают два процесса – объемная полимеризация и полимеризация по границе раздела фаз на поверхности субстрата. ПАНИ-покрытие на поверхности подложки образуется вследствие последовательно протекающих процессов: пограничной полимеризации, адсорбционной полимеризации (связанной с объемной полимеризацией) и деструкции.

Не останавливаясь на предположениях, сделанных авторами [321] по поводу причин, вызывающих деструкцию ПАНИ-покрытия, следует заметить следующее. По-видимому, это наблюдение является следствием использованием низких концентраций реагентов (и явно малой площади поверхности вносимого субстрата) при пониженных температурах, что, очевидно, привело к значительному увеличению продолжительности процесса и к проявлению эффектов, интерпретированных как результат деструкции ПАНИ. В исследовании [321] не учитывалось влияние постоянно изменяющегося значения рН среды (как во время проведения полимеризации, так и при процедуре отмывки образцов), и эффектов, вызываемых самоорганизацией феназиновых структур, поскольку на тот момент еще не были получены результаты комплексных исследований механизма полимеризации анилина [263].

Таким образом, в результате модифицирования твердых носителей ПАНИ-покрытия методом химического осаждения, как правило, удается получать стабильные композиты. Технологическое преимущество, обеспечиваемое синтезом ПАНИ-содержащих сорбентов по сравнению, например, с процессами получения фторполимерсодержащих материалов радиационными методами, определяется мягкими условиями полимеризации (комнатная температура, водная среда, отсутствие сложного оборудования). Технические проблемы при получении ПАНИ-содержащих композитов могут возникать из-за сложности кинетики полимеризации анилина в присутствии носителя. Это во многом определяет эмпирический подход к подбору состава реакционной смеси и условий полимеризации, которые должны препятствовать формированию разветвленных структур полимера и протеканию нежелательных деструкционных процессов.

1.7.3. Полимеризация анилина в присутствии растворимых полисульфокислот

Внимание исследователей к «матричной полимеризации» анилина в присутствии растворимых поликислот в первую очередь связано с возможностью получения новых материалов, сочетающих особые свойства ПАНИ с механическими свойствами полимерных материалов – носителей [323]. В пионерских исследованиях матричной полимеризации, проводимых Кабановым с сотр. с конца 60-х годов прошлого века [324-326], были разработаны подходы к изучению кинетики и механизмов образования интерполимерных комплексов, а также их химической

структуры. Такие полимер-полимерные комплексы следует рассматривать как новые полимерные материалы, свойства которых существенно отличаются от свойств исходных полимеров [327-329]. Особенности матричной полимеризации и возможности, которые дает использование этого метода при синтезе композиционных материалов, обсуждаются в обзоре Паписова [330].

В матричном синтезе ПАНИ использовали различные поликислоты, такие как, например, полиакриловая кислота, полиметакриловая кислота, полистиролсульфокислота, (ПАМПСК) и другие [331-333], отличающиеся регулярным расположением остатков кислотных групп вдоль полимерной цепи. Предполагали, что в результате протонирования анилина использованными поликислотами формирующиеся макромолекулы ПАНИ должны располагаться вдоль цепи макромолекулы поликислоты с образованием двутяжной молекулярной структуры интерполимерного комплекса. При этом конформации макромолекул поликислоты и ПАНИ должны изменяться, подстраиваясь друг к другу [323].

В упомянутой работе [323] также было показано, что эффективный синтез ПАНИ можно осуществить в присутствии поликислот, в макромолекулах которых кислотные группы распределены нерегулярно. Такие поликислоты являются ароматическими полиамидами [334], которые получают в результате поликонденсации хлорангидридов *изо*- и *тере*-фталевой кислот и 4,4'-диаминофенил-2,2'-дисульфоната натрия (а именно, *изо*-ПСК - из изофталевой кислоты и *тере*-ПСК - из терефталевой кислоты) [335].

При полимеризации анилина в присутствии указанных полисульфокислот наблюдали рост индукционного периода полимеризации. Авторы исследования [323] объяснили этот эффект конформационными затруднениями в макромолекулах поликислоты в силу их жесткости, неравномерностью распределения сульфогрупп вдоль цепи макромолекулы, а также неполным переходом этих групп из Na^+ - в H^+ -форму. Перечисленные факторы повышают продолжительность индукционного периода, приводят к понижению степени полимеризации и изменяют электронное строение макромолекулы ПАНИ. Автокаталитический характер матричной полимеризации анилина подтверждается результатами полимеризации анилина в присутствии "затравки" (предварительно синтезированные частицы ПАНИ).

В случае полимеризации анилина, протонированного жесткоцепной сульфокислотой, следует ожидать низкую степень полимеризации, когда макромолекулы ПАНИ формируются в виде боковых цепей, растущих в виде «щеточки» от кислотных остатков макромолекулы полисульфокислоты. В исследовании [323]

проведена «затравочная» полимеризация анилина, причем «затравкой» являлась часть интерполимерного комплекса, в котором происходит полимеризация анилина. Данные электронной спектроскопии и вискозиметрии подтвердили формирование гребнеобразной структуры, в которой макромолекулы ПАНИ связаны с макромолекулой поликислоты ионными связями и образуют боковые цепи. В случаях, когда концентрация анилина превышала концентрацию сульфогрупп в поликислоте, имело место формирование смешанной структуры, когда определенная доля звеньев макромолекулы ПАНИ располагалась вдоль цепи поликислоты, а остальные звенья образовывали боковые цепи.

Результаты исследований, упомянутых в настоящем подразделе, несомненно, интересны с практической точки зрения, поскольку интерполимерные комплексы ПАНИ с поликислотами можно рассматривать в качестве эффективных полимерных модификаторов поверхности твердых носителей при разработке технологичных способов синтеза ПАНИ-содержащих композитов для выделения НК и разделения компонентов биологических смесей.

Анализ научной литературы, опубликованной за последние годы, позволяет высказать несколько критических замечаний в отношении существующих методов выделения биополимеров из биологических образцов (в частности, НК) и используемых для этого материалов. Прежде всего, следует отметить, что подавляющее большинство известных методов с применением сорбентов (хроматография, твердофазная экстракция) основаны на удерживании целевого биополимера сорбентом на первом этапе выделения («*позитивная селекция*»), после чего необходимо отмыть удерживаемый компонент от примесей и элюировать очищенный целевой компонент с поверхности сорбента. Многостадийность процедуры выделения (в основу которой положен механизм обратимой сорбции макромолекул выделяемого биополимера сорбентом) не только приводит к потерям выделяемого компонента биологической смеси, но также ухудшает воспроизводимость по таким параметрам, как выход и степень очистки выделяемого вещества.

Несмотря на то, что все необходимые манипуляции, используемые в процедуре выделения биополимера, могут быть частично или полностью автоматизированы, большинство автоматических систем отличаются дороговизной и часто сложны в

эксплуатации. Простое и доступное одноразовое универсальное устройство, основанное на использовании композиционных полимерсодержащих сорбентов и обеспечивающее одностадийное, воспроизводимое и эффективное выделение НК из биологических образцов, различающихся происхождением и составом, до сих пор не было описано.

Таким образом, выявляется круг проблем, которые могут быть решены с использованием междисциплинарного подхода, предусматривающего комплексное применение химико-технологических, физико-химических и молекулярно-биологических методов. С целью получения материалов, демонстрирующих «негативную селекцию» в отношении НК, необходимо разработать масштабируемые технологии, обеспечивающие формирование нанотолщинных покрытий полимеров (проявляющих такие свойства) на поверхности твердых носителей. Кроме того, необходимо разработать специальные *биосепарирующие элементы* (например, картриджи с дисперсным сорбентом, модифицированные полимерами капилляры, синтетические мембраны, твердые пластины и др.), в состав которых будут включены полученные сорбенты, и оптимальные протоколы пробоподготовки с целью выделения биополимеров из различных источников, обеспечивающих достижение заданных параметров выделения.

В силу своих физико-химических свойств перспективным полимерным модификатором при получении материалов для одностадийного выделения НК представляется ПАНИ. Во-первых, ПАНИ является рН-чувствительным материалом, сорбционные свойства которого можно контролировать, изменяя рН среды. Во-вторых, в результате модифицирования твердых носителей ПАНИ-покрытиями удается получать стабильные композиты. Технологическое преимущество, обеспечиваемое синтезом ПАНИ-содержащих сорбентов, определяется мягкими условиями полимеризации. Кроме того, эффективными полимерными модификаторами могут служить интерполимерные комплексы ПАНИ с поликислотами.

Необходимо установить, пригодны ли ПАНИ-покрытия для селективного разделения смесей биополимеров (на момент постановки задачи настоящего исследования такие данные в литературе отсутствовали). Затем следует провести сравнительное исследование сорбционных свойств перфторполимеров, частично фторированных полимеров и ПАНИ в отношении биополимеров (НК и белков), а также выяснить, демонстрируют ли эффект «негативной селекции» в отношении НК полимеры других классов.

В заключение необходимо отметить, что сегодня в лабораториях РФ, как правило, процедуры выделения и очистки НК из клинического материала производятся вручную. Отсутствие доступных и надежных наборов для рутинной обработки клинических образцов создает условия повышенного риска заражения инфекционным материалом, а также может приводить к получению ложных результатов при диагностике, что сказывается на профилактике здоровья населения и на эффективности лечения пациентов.

Очевидно, что разработка технологичных и масштабируемых способов синтеза доступных и эффективных композиционных сорбентов, а также результативных методов экспресс-пробоподготовки с использованием полученных композитов в молекулярной диагностике представляются актуальными и востребованными.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ, ИСПОЛЬЗОВАННАЯ АППАРАТУРА, РАЗРАБОТАННЫЕ МЕТОДИКИ СИНТЕЗА СОРБЕНТОВ И ПРОТОКОЛЫ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

2.1. Носители для синтеза сорбентов

При получении композиционных сорбентов использовали различные твердые (как неорганические, так и органические) носители. Объемно-пористые кремнеземы применяли благодаря их жесткости, контролируемой пористости и развитой поверхности. Применение картриджей (БЭ), содержащих дисперсные сорбенты с развитой поверхностью, оказалось оптимальным для выделения ДНК из большинства проб. Выбор других носителей был продиктован свойствами образца, из которого следовало выделять НК. Так, для выделения ДНК особо опасных патогенов подходили мультикапиллярные полимермодифицированные наконечники (благодаря отсутствию стадии центрифугирования снижался риск контаминации). БЭ, содержащие кроме специального сорбента дополнительный слой удерживающего жидкость материала, использовали при работе с образцами с низким содержанием ДНК. Мембранные сорбенты оказались эффективны при выделении ДНК из проб, содержащих наиболее распространенные бактериальные возбудители урогенитальных инфекций, а также при выделении вирусных частиц из биологических проб. Выбор носителя также зависел от назначения получаемого материала (при синтезе олигонуклеотидов использовали дисперсные носители; при масс-спектрометрии белковых анализов – полимермодифицированные кремниевые пластины).

Таким образом, при получении композиционных сорбентов использовали следующие типы носителей, названия и основные характеристики которых перечислены ниже.

1. Дисперсные объемно-пористые кремнеземы различных марок, включая:

- макропористые стекла (МПС): МПС-2000ГХ, МПС-1150ГХ, МПС-500ГХ, МПС-250ГХ (*Горьковский опытный завод ВНИИНП, Россия, фракция 0.25-0.5 мкм; численные значения в обозначении марки МПС соответствуют средним эффективным диаметрам пор в Å*); удельный объем пор и удельная поверхность (определенные методом ртутной порометрии) использованных марок МПС оговариваются в последующих главах диссертации (МПС перед использованием выдерживали в 18% соляной кислоте в течение 72 ч, отмывали водой до нейтральных значений рН смывов, сушили до постоянного веса в вакуумном сушильном шкафу 17 ч при 70°);

- силикагели: GPB-500-Trisorpor™ (*Shuller GmbH*, Германия, фракция 100–200 мкм, удельный объем пор 0.9 см³/г, удельная поверхность 75 м²/г); Si-500 (*ЗАО НИИ «Химтех»*, Армения; фракция 100-160 мкм, удельный объем пор 0.9 см³/г, удельная поверхность 75 м²/г); Silica Gel 60 (*Merk KGaA*, Германия, фракция 63–200 мкм, удельный объем пор 0.9 см³/г, удельная поверхность 75 м²/г).

2. Ионообменная смола Dowex, тип 50W×2, mesh 200-400 (*Serva*, Германия).

3. Синтетические полимерные мембраны, включая:

МКМ (капроновая) с размером пор 0.8 мкм и 3 мкм; ММК (полиамидная) с размером пор 0.15 мкм, 0.2 мкм, 0.45 мкм, 0.65 мкм и 1.4 мкм; ММПА (полиамидная) с размером пор 0.2 мкм; МФФК (фторопластовая) с размером пор 0.45 мкм – все производства *ООО НПП «Технофильтр»*, Россия; GPWP (полиэфирсульфоновая) с размером пор 0.2 мкм (*Merk Millipore*, США).

4. Стекланные мультикапилляры из боросиликатного стекла, содержащие 4417 капилляров с диаметром 40 мкм, причем толщина многоканальной системы составляет 3.35 мм, длина 30 см (*ООО НПП «Наноструктурная технология стекла»*, Россия).

5. Кремниевые пластины (чипы) с размерами: 70 x 8 x 0.5 мм в окисленной (в результате нагревания до 1000°С с последующей обработкой кислородом в течение 4 ч) и в не окисленной формах (любезно предоставлены компанией *Royal Philips Electronics, Philips Research Aachen*, (Германия)).

2.2. Полимерные модификаторы

Как правило, полимерные модификаторы синтезировали непосредственно на поверхности выбранных носителей в результате прямого синтеза наноструктурированного композита. Таким способом получали нанопокртия на основе полифтобутадиена, политетрафторэтилена, сополимеров тетрафторэтилена с гексафторпропиленом, аллиламином и с аллиловым спиртом; ПАНИ, сополимеров анилина с 3-аминобензойной кислотой или с *о*-толуидином; интерполимерных комплексов ПАНИ с *изо*-ПАСК, что детально описано в соответствующих главах диссертации. Исключением являются разработанные в ходе исследования методы с применением следующих готовых полимеров: фторпласта 42Л (*ГалоПолимер*, Россия), поли(1,2,2-трифтор-1-{1,1,2,3,3,3-гексафтор-2-[1,1,2,2-тетрафтор-2-(фторсульфонил)этокси]пропокси}бутан-1,4-диила) (“*PFOB*”) и поли{1,2,2-трифтор-1-[1,1,2,2,3,4,4,4-октафтор-3-(1,1,2,2-тетрафтор-3-метокси-3-оксопропокси) бутокси]}

бутан-1,4-диила} (“EVE”) (*Du Pont*, США), а также серии специально синтезированных полиарамидов (любезно предоставленных проф. Др.-Дж. Ляо, *National Taiwan University of Science and Technology*, Тайвань), содержащих ароматический азот, фтор, а также донорные и акцепторные фрагменты, (подробно описанных в Главе 3).

2.3. Прочие реагенты

Для синтеза композитов, проведения пробоподготовки образцов биоматериала и для аналитических тестов использовали следующие реагенты марок ос. ч. или ч. д. а. с чистотой 98.0-99.5% без дополнительной очистки (если не указано иное): олигобутадиен (молекулярная масса 5000, содержание 1,2-звеньев – 20%, содержание 1,4-звеньев – 80%), глицерин, β -меркаптоэтанол, буфер Laemmly, кислота уксусная, поли-2-(акриламидо-2-метил-1-пропан)-сульфоновая кислота (15% водный раствор, M_w 2000000) - все от компании *Aldrich*, Германия; агароза тип 1 (универсальная, низкий ЕЕО) (*Fluka*, Швейцария), акриламид, N',N' -метилен-бис-акриламид, трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), ЭДТА- Na_2 , додецилсульфат натрия, персульфат аммония, ТЕМЕД, сульфат аммония, альгинат натрия, гидроксид натрия, акриламид, сахароза – все от компании *Sigma*, Германия; оранжевый Ж, этидия бромид, бромфеноловый синий, кумасси G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250), аллиловый спирт, аллиламин, ацетат натрия, борная кислота, Тритон-X-100, уксусная кислота, хлорид натрия, хлорид кальция, 2-меркаптоэтанол – все от компании *Merk*, Германия; глицин, маркер (белковая смесь: лизоцим, 12 кДа, β -лактоглобулин, 19 кДа, угольная ангидраза, 28 кДа, овальбумин, 45 кДа, бычий сывороточный альбумин, 68 кДа, фосфоорилаза В, 107 кДа, миозин - Н-цепь, 208 кДа), буферные растворы: ТЭ, pH 7.4 (Трис, Na_2 -ЭДТА), боратный буфер, pH 9.0, ТБЭ, pH 8.0 (Трис, борная кислота, Na_2 -ЭДТА), лизирующая система (буфер для лизиса клеточной стенки, оболочки и протеолиза, а также смесь детергентов) – все от компании *MIRA-Diagnostica, GmbH*, Германия; анилин 99.5%, extra pure (*ACROS ORGANICS*, Германия), анилин (ГОСТ 5819-78, НППФ «Биореактив», Россия, - перегоняли, собирали фракции от 182 до 184⁰С, n_{d}^{20} =1,5863, аликвоты по 10 мл хранили при -20⁰С); тетрафторэтилен, гексафторпропилен (*ОАО Кирово-Чепецкий химический комбинат*, Россия); метиловый оранжевый, хлорид бария (оба ч. д. а., *Реахим*, Россия), йодид калия, ч., ГОСТ 4232-74 (*Уральский завод химреактивов*, Россия), водный аммиак 25% (ГОСТ 24147-80) “ОСЧ 25-5”, (*Гродненское ПО “Азот”*,

Белоруссия); кислота азотная “ОСЧ 18-4”, кислота серная ос. ч., кислота соляная “ОСЧ 20-4” (ГОСТ 3118-77) – все от компании *Химмед*, Россия;

В приведенном списке некоторые реагенты могут отсутствовать (например, соли для приготовления буферных растворов, когда был важен не состав раствора, а рН буферной смеси, а также в случаях, когда свойства полученных материалов тестировали вне ИБХ РАН).

2.4. Растворители

В исследовании использовали ацетон “ОСЧ 9-5”, диметилформамид х. ч., тетрагидрофуран стабилизированный х. ч., хлороформ х. ч.; изопропиловый спирт (ч. д. а.), *n*-пентан х. ч. - все от компании *Химмед*, Россия; ацетонитрил 99.98 %-ный, PanReac AppliVhem (Испания), диоксан сцинтилляционный (*Реахим*, Россия), спирт метиловый (ГОСТ 2222-95) марки А (ОАО “Щекиназот”, Россия), спирт этиловый 96 %-ный (ГОСТ 5962-2013) (ОАО «Медхимпром», Россия). Воду деионизировали на установке Milli Q RG ultra pure water system (*Millipore*, США).

2.5. Биополимеры (включая ферменты)

Использованные в работе РНКаза (*Calbiochem*, Швейцария), протеиназа К, лизоафин, рестриктазы *Ecu RI*, *Hinf* – предоставлены компанией *MIRA-Diagnostica GmbH*, Германия; образцы плазмиды pBR322 предоставлены Учебным центром ИБХ РАН; бычий сывороточный альбумин (*Sigma*, Германия), миоглобин, пепсин, лизоцим, цитохром С - все производства компании *AppliChem GmbH*, Германия). Также использовали высокомолекулярную ДНК из тимуса телёнка (*БИОЛАР*, Россия), ДНК из молок лососевых рыб (*Thermo Fisher Scientific*, США), ДНК-маркер (GeneRuler™ 20000—75 п.о., *Fermentas*, США).

2.6. Биологические образцы

Штаммы бактерий и бактериофагов предоставлены компаниями *MIRA-Diagnostica GmbH* и *NextTec GmbH* (Prof. R.-M. Leiser, Германия), группой Молекулярной диагностики ИБХ РАН (д.б.н. проф. С.К. Завриев) и Учебно-научным центром ИБХ РАН (д.х.н. проф. Т.В. Овчинникова). Образцы крови животных (коров и свиней) предоставлены ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста (академик РАН д.б.н.

проф. Н.А. Зиновьева). Образцы крови здоровых доноров предоставлены АНО «Центр биотической медицины» (д.м.н. проф. А.В. Скальный, г. Москва). Ткани растений (*Nicotiana Tabacum L.*) предоставлены Филиалом ИБХ РАН (г. Пушкино). Семена злаков и культура *Fusarium graminearum* предоставлены группой Молекулярной диагностики ИБХ РАН. Образцы почв и фракции гуминовых кислот предоставлены Группой молекулярной экологии ФИБХ РАН, г. Пушкино (к.х.н. О.Е. Трубецкая).

Эксперименты с образцами мокроты больных туберкулезом проводили в ЗАО «НПФ Синтол» (г. Москва). Эксперименты по выделению ДНК вируса гепатита В из образцов крови и плазмы человека проводили в ФГБУ НМИЦ Гематологии Минздрава России (г. Москва). Эксперименты с образцами урогенитальных мазков проводили в ООО «НПФ Генлаб» (г. Москва) и ООО «Амбер» (г. С.-Петербург). Эксперименты с образцами особо опасных инфекций проводили на базе Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН (г. Пушкино) и ФКУЗ РосНИПЧИ Роспотребнадзора МИКРОБ (г. Саратов). Эксперименты с вирусами лихорадки Синдбис, западного энцефаломиелита лошадей и с вирусом гриппа проводили на базе ФНИЦ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи. Оптимизацию условий ВЭЖХ-определения витаминов, выделенных из крови с помощью разработанных сорбентов, проводили на базе АНО «Центр биотической медицины» (г. Москва). Тесты по исследованию свойств полимермодифицированных кремниевых чипов с использованием белковых и пептидных смесей проводили на базе компании Royal Philips Electronics, Philips Research Aachen (Германия). Оценку эффективности разработанных фторполимерсодержащих носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов проводили на базе компании Proligo Biochemie GmbH (Германия).

Все эксперименты с использованием патогенных микроорганизмов и клинических проб проводили на базе перечисленных выше отечественных и зарубежных научных и научно-производственных организаций с использованием аппаратной базы, наборов и реагентов и в соответствии с лабораторными протоколами, разработанными в указанных организациях.

2.7. Аппаратура

В этом параграфе для большинства устройств (приборов), использованных при синтезе и оценке свойств композиционных сорбентов, не указаны их марки и изготовители, поскольку в рамках исследования использовали разнообразные

стандартные устройства (в зависимости от учреждения, в котором проводили исследования), такие как ультразвуковые ванны, УФ- и ИК-спектрофотометры, рН-метры, ВЭЖХ-системы, центрифуги, настольные приборы для горизонтального и вертикального электрофореза, термостаты, электронные весы, перистальтические насосы, вакуумные испарители, мешалки и шейкеры, сушильные шкафы, общепотребительный лабораторный пластик и химическое стекло, механические дозаторы и т. п. Отдельно следует перечислить специальные приборы и устройства, необходимые для проведения исследований: ртутный порометр Pore Sizer 9300 (*Micromeritics*, США); озонатор ОГВК-20 (*PDF Version*, С.-Петербург), субмикронный анализатор частиц Coulter N4MD (*Coulter Electronics*, Великобритания), оптический микроскоп *Olympus Vanox-T* (*Olympus*, Япония) со встроенной фотокамерой, ИК-Фурье-спектрометр *SPECTRUM 2000* с ИК-микроскопом I серии (*Perkin-Elmer*, США), алмазная кювета высокого давления (*High Pressure Diamond Optics INC*, США), трансиллюминатор UV Transilluminator Bio-Doc-It™ System (*UVP*, США), пробоотборные пакеты для газов (*SKC*, США), сканирующий зондовый нанотвердомер Наноскан-3D» (ФГБНУ ТИСЧУМ, Россия).

В соответствующих главах диссертации обсуждаются особенности пробоподготовки при использовании методов ВЭЖХ, СКИ и РФЭС.

2.8. Методы синтеза композиционных сорбентов на основе кремнезема

В этом подразделе дано описание условий синтеза сорбентов, разработанных в ходе проведенного исследования. В последующих главах диссертации при обсуждении особенностей синтеза конкретных материалов особо оговариваются изменения в базовой конструкции этих установок или режимов проведения синтеза, если таковые имели место.

2.8.1. Нанесение слоев олигобутадиена на поверхность кремнезема проводили в специально сконструированном стеклянном реакторе (объемом 250 мл, Рисунок 4.8), в который помещали навеску носителя (10 - 75 г). Реактор посредством шланга был соединен с сосудом (делительной воронкой или со стеклянным шприцем), содержащим раствор олигобутадиена (0.125 - 1.25 г /г носителя) в *n*-пентане (45 - 150 мл). В крышку реактора была впаяна трубка с вентилем, соединенная с линией вакуумного масляного насоса. Частицы носителя высушивали в вакууме до постоянного веса, затем линию насоса перекрывали и подавали раствор олигомера через стеклянную трубку, впаянную в крышку реактора. Трубка была устроена таким

образом, что раствор олигомера, всасывающийся в объем реактора за счет разности давлений, подавался на дно реактора, и, проходя сквозь слой носителя, смачивал его, интенсивно впитываясь в поры частиц. В результате получали равномерно смоченный раствором полимера плотный слой носителя. Затем реакционный сосуд в течение 15 мин обрабатывали в ультразвуковой ванне при атмосферном давлении. После «озвучивания» суспензии растворитель отгоняли на роторном испарителе на водяной бане (70°C). Полученный полупродукт белого цвета не смачивался водой. Его сушили в вакууме при комнатной температуре в течение 6 ч, получая материал, который затем подвергали фторированию.

2.8.2. Прекурсоры (кремнеземы, модифицированные фторопластом 42Л или частично фторированными сополимерами *PFOB* и *EVE*), **а также модельные сорбенты** (кремнеземы, модифицированные фторопластом 42Л, полиарамидами) **получали** методом «кастинга» на установке, конструкция которой описана в п. 2.9.1., в тех же условиях, как и при нанесении нанослоев олигобутадиена на поверхность кремнеземных частиц. Загрузки, использованные при получении кремнеземов, модифицированных полиарамидами, приведены в Главе 3.

При модифицировании кремнезема частично фторированными сополимерами *[поли(1,2,2-трифтор-1-{1,1,2,3,3,3-гексафтор-2-[1,1,2,2-тетрафтор-2-(фторсульфонил)этокси]пропокси}бутан-1,4-диила) (“PFOB”)]* из его раствора в трифтортрихлорэтаноле (хладон R-113) и *поли{1,2,2-трифтор-1-[1,1,2,2,3,4,4,4-октафтор-3-(1,1,2,2-тетрафтор-3-метокси-3-оксопропокси)бутокси] бутан-1,4-диила}* (“EVE”) из его раствора в ацетоне) использовали растворы указанных полимеров в соответствующих растворителях, содержащих по 0.05 г сополимера на каждый грамм кремнеземного носителя.

2.8.3. Синтез полифторбутадиенсодержащего сорбента. Фторирование кремнезема, обработанного олигобутадиеном, проводили в специальном устройстве в режиме «псевдооживления» в атмосфере аргона в течение 1 - 4 ч. Цилиндрический реактор в составе устройства заполняли навеской фторируемого материала и парами возгоняемого при 65 °С дифторида ксенона. В результате получали сыпучий сорбент белого цвета, который не смачивался водой. Для удаления летучих побочных продуктов полученный материал сушили в вакууме в течение 1.5 - 4 ч при 25 - 80 °С.

2.8.4. Получение ФП-содержащего сорбента. Модифицирование кремнеземных частиц фторопластом проводили следующим образом: 100 г кремнеземных частиц загружали в специальный реактор (Рисунок 2.1), высушивали в

вакууме 30 – 40 мин, затем к частицам добавляли 500 мл 0.016 %-го раствора ФП в ацетоне. Реактор, содержащий суспензию частиц кремнезема в растворе ФП, выдерживали 15 мин в ультразвуковой бане при атмосферном давлении. Растворитель удаляли на роторном испарителе на водяной бане при 40 – 45 °С. Затем вводили дополнительную порцию (500 мл) раствора ФП в ацетоне и повторяли манипуляции, проводимые после добавления первой порции раствора ФП. Полученный продукт сушили в вакууме до постоянного веса.

2.8.5. Полистиролсодержащий кремнезем получали методом радиационной пост-сополимеризации стирола с дивинилбензолом. Исходный кремнезем помещали в стеклянную ампулу и присоединяли ее к вакуумной установке. Ампулу вакуумировали при 550 К до остаточного давления 10^{-3} торр, после чего охлаждали до комнатной температуры и вводили тетрафторэтилен.. Охлаждали до температуры жидкого азота и облучали источником гамма-облучения дозой 4 Мрад, затем систему выдерживали при комнатной температуре 6 ч. После этого ампулу размораживали до комнатной температуры. После выработки мономера ампулу вакуумировали до постоянного давления 10^{-3} торр. Вводили пары стирола и дивинилбензола и выдерживали 4 ч. Избыток стирола и дивинилбензола удаляли из ампулы вакуумированием при 350 К. После этого ампулу охлаждали и отсоединяли от установки.



Рисунок 2.1 – Реактор для модифицирования частиц кремнезема полимерными покрытиями методом «кастинга».

Навески полученного полистиролсодержащего носителя (по 2 г) помещали в круглодонные колбы, снабженные обратным холодильником. К каждой навеске

приливали по 10 мл концентрированной серной кислоты. Реакцию проводили при 90°C. Степень сульфирования регулировали, изменяя продолжительность проведения реакции. По окончании сульфирования суспензии фильтровали, промывали дистиллированной водой до нейтрального значения pH и сушили в вакууме при комнатной температуре до стабилизации веса. Концентрацию поверхностных сульфогрупп определяли титрованием. В колбу, содержащую навеску носителя (0.3 г), приливали 20 мл 0.01 Н NaOH. Смесь выдерживали при постоянном перемешивании в течение 30 мин. Отбирали пробы по 5.5 мл и пропускали через фильтр, к 5 мл полученного фильтрата добавляли по капле 0.2% раствора метилового красного в метаноле. Затем проводили титрование 0.01 Н HCl. По полученным данным рассчитывали количество поверхностных сульфогрупп: $\eta_{\text{SO}_3\text{H}} = V_{\text{NaOH}} \cdot (C_{\text{NaOH}} - C_{\text{NaOH}} V_{\text{равновесн. NaOH}} / V_{\text{пробы}}) \cdot m_{\text{навески}}^{-1}$.

2.8.6. Модифицирование сульфостиролсодержащей матрицы ПАНИ проводили на установке, представляющей собой вакуумируемый сосуд с навеской носителя (10 г), соединенный со снабженным поршнем цилиндром, содержащим предварительно приготовленный раствор анилина (из расчета $4.2 \cdot 10^{-4}$ моль анилина на 1 г сорбента в 10 мл 1 М HCl). После вакуумирования линию насоса перекрывали и подавали раствор мономера через трубку, устроенную таким образом, что раствор, проходя сквозь слой носителя, смачивал его, заполняя поры частиц. Систему инкубировали 10 минут при постоянном перемешивании. Затем в сосуд добавляли водный раствор окислителя (10 мл водного раствора, содержащего персульфат аммония из расчета 0.192 г на 1 г сорбента). Полимеризацию проводили при перемешивании при комнатной температуре. Реакцию останавливали, добавляя в колбу 50 мл 1 М водного раствора аммиака, и выдерживали полученный композит в аммиаке 60 мин. Полученный сорбент промывали водой до нейтрального значения pH. Отмытый сорбент инкубировали в 50% водном растворе метанола 17 ч, затем промывали на воронке метанолом и дистиллированной водой до нулевого поглощения в диапазоне длин волн 200 - 700 нм. Носитель сушили в вакууме при комнатной температуре до стабилизации веса.

Аналогичным образом получали ПАНИ-покрытие на поверхности частиц ионообменной смолы Dowex (смолу использовали после проведения процедуры набухания, проведенной в соответствии с протоколом компании-производителя). К суспензии гранул смолы при перемешивании добавляли раствор анилина (из расчета $4.2 \cdot 10^{-4}$ моль анилина на 1 г сухой смолы в 10 мл 1 М HCl), перемешивали 10 мин при комнатной температуре и добавляли водный раствор окислителя (10 мл водного

раствора, содержащего персульфат аммония из расчета 0.192 г на 1 г сухой смолы). Затем повторяли манипуляции, проводимые при получении ПАНИ-модифицированного сульфостиролсодержащего кремнезема.

2.8.7. Модифицирование неактивированного кремнезема ПАНИ.

Кремнезем марки Trisorog-500 (средний диаметр частиц 100 – 200 мкм, средний эффективный диаметр пор - 40 нм; Shuller GmbH, Германия) высушивали в вакууме в специально сконструированном реакторе (п. 2.10.1). Затем в реактор вводили смесь реагентов (к 20 г кремнезема добавляли 3.6 мл анилина, предварительно растворенного в 50 мл 2 М HCl, непосредственно перед добавлением смешанного с 30 мл водного раствора, содержащего 8.4 г персульфата аммония). Суспензию перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Затем прибавляли 100 мл 1 М водного аммиака. Смесь выдерживали 17 ч. Полученный сорбент промывали водой, метанолом, ацетонитрилом и ацетоном, а затем высушивали в вакууме до постоянного веса.

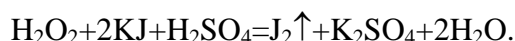
2.8.8. Синтез ПТФЭ-содержащих сорбентов на основе обработанного озоном кремнезема. Гексафторпропилен (ГФП), аллилмин (АА) или аллиловый спирт (АС) использовали в качестве сомономеров для получения функционализированных ПТФЭ-содержащих сорбентов. Сомомеры вводили одновременно или последовательно.

В первом случае кремнезем Si-500 (10 г) помещали в специальное устройство, оснащенное озонатором ОГВК-20К (*МЭЛП*, Россия), обеспечивающим выход озона не менее 20 г/ч при расходе воздуха 5 л/мин. Обработку носителя озоном проводили при комнатной температуре в течение 0.5 - 5 ч. Затем систему нагревали до 310 К и инкубировали в течение 0.5 ч. Затем смесь газообразного ТФЭ с парами АА или АС вводили в реактор, систему инкубировали в течение 2 ч и вакуумировали. Полученные сорбенты промывали ацетоном, метанолом и водой до отсутствия УФ-поглощения фильтрата и сушили в вакуумном шкафу.

Во втором случае кремнезем Si-500 (10 г) обрабатывали озоном при комнатной температуре в течение 4 ч в токе воздуха (3 л/мин), а затем избыток озона удаляли, продувая через систему воздух. Затем в реактор вводили мономеры (ТФЭ и ГФП, ТФЭ и АА или ТФЭ и АС) в мольном соотношении 1: 1 (общая масса мономеров составляла 5 г для каждого случая). После введения каждого сомомера систему инкубировали в течение 1 ч, продукт сушили в вакуумном шкафу.

Содержание привитой полимерной фазы в полученных материалах определяли гравиметрически. Содержание поверхностных аминогрупп или гидроксильных групп в полученных покрытиях определяли титрованием (см. ниже).

С целью качественного обнаружения и количественного определения пероксидов на поверхности кремнезема, обработанного озоном, готовили раствор йодида калия. Йодид калия (1 г) растворяли в 10 мл дистиллированной воды, добавляли 3-4 капли концентрированной серной кислоты и перемешивали. Раствор хранили в темноте при комнатной температуре. Перекисные группы обнаруживаются благодаря протеканию реакции:



Полученный раствор йодида калия по каплям добавляли к навеске озонированного кремнезёма и к навеске необработанного образца (взятого в качестве контроля). Обработанные озоном образцы окрашивались в желтый цвет.

Затем к растворам перекиси водорода с концентрациями 3.0 %, 2.5 %, 2.0 %, 1.5 % и 1.0% добавляли эквивалентное количество раствора йодида калия. Смесь инкубировали 1 мин. Отбирали аликвоты (по 5 мкл), доводили их объем до 2 мл и анализировали спектрофотометрически при 286 нм. По полученным данным строили калибровочную кривую.

В микропробирку вносили 100 мг исследуемого кремнеземного образца, добавляли 250 мкл воды и 750 мкл раствора йодида калия. Смесь выдерживали 2 мин. 5 мкл смеси переносили в кювету для спектрофотометрии и доводили ее объем водой до 1500 мкл. Анализировали полученный раствор при 286 нм. Определяли содержание пероксидов в образцах. Для обработанного озоном кремнезема это значение составило ~ 0.0165 % / 100 мг. Для обработанного озоном ФП-содержащего кремнезёма содержание поверхностных пероксидов составило ~ 0.0405 % / 100 мг.

2.8.9. Синтез ПАНИ-содержащего сорбента на основе обработанного озоном кремнезема проводили следующим образом. 20 мл 0.1 М раствора анилина в 1 М HCl добавляли к 3 г свежееозонированного кремнезема Si-500. Смесь нагревали при слабом перемешивании при 50 °С в течение 1 ч и затем оставляли на 24 ч. Полученный сорбент промывали водой, этанолом и снова водой до отсутствия поглощения фильтрата в УФ-диапазоне и сушили в вакуумном шкафу.

2.8.10. Синтез ФП-ПАНИ-содержащего сорбента проводили в присутствии ФП-модифицированного кремнезема (п. 2.10.2.1) при комнатной температуре. 100 г ФП-кремнезема загружали в реактор (Рисунок 2.1) и суспендировали в 300 мл этанола. Основной объем растворителя отгоняли, вакуумируя реактор в течение 30

мин. Затем в реактор быстро вводили 100 мл свежеприготовленной смеси раствора анилина (16.8 мл анилина в этаноле в присутствии соляной кислоты; мольное соотношение анилин:HCl равнялось 1:0.9). Систему выдерживали в течение 10 мин. Затем в реактор добавляли 100 мл водного раствора ПСА (мольное соотношение анилин:ПСА равнялось 1:1). Через 15 мин супернатант, содержащий не сорбированные анилиновые олигомеры, удаляли, а в реактор вводили еще 50 мл раствора анилина и 200 мл этанола. Реакцию проводили при постоянном перемешивании. Продукт темно-синего цвета последовательно промывали этанолом и водой до отсутствия оптического поглощения фильтрата в диапазоне 200 – 700 нм. Полученный сорбент сушили под вакуумом до постоянного веса.

2.8.11. Силаминирование поверхности частиц кремнезема. 100 г кремнеземного носителя (Si-500, Армения) обрабатывали кипячением в дистиллированной воде (30 – 40 мин). После высушивания под вакуумом гидроксированного кремнезема к навеске добавляли 300 мл 5 %-ного γ -АПТЭС и выдерживали суспензию при слабом перемешивании 30 мин. Избыток жидкости удаляли на воронке, затем силаминированный кремнезем промывали 20-кратным объемом воды (по отношению к объему раствора аминсилана) и сушили в вакууме до постоянного веса.

С целью определения количества поверхностных аминогрупп на силаминированном кремнеземе в колбу, содержащую навеску кремнезема (100 г), вводили 300 мл 0.01 н HCl. Суспензию перемешивали 30 мин. Раствор отфильтровывали. Отбирали пробы по 2 мл, добавляли несколько капель 0.2% раствора метилового красного в метаноле. Титровали пробы 0.01н NaOH. Количество поверхностных аминогрупп (η) рассчитывали по формуле:

$$\eta(NH_2) = \frac{V(HCl)}{m_{\text{кремнезема}}} \cdot \left(C_0(HCl) - \frac{C_0(NaOH) \cdot V(NaOH)}{V_{\text{пробы}}} \right)$$

Концентрация поверхностных аминогрупп $\eta(NH_2)$ в полученном силаминированном кремнеземе составила 0.56 ± 0.02 ммоль/г.

С целью определения количества поверхностных сульфогрупп в полученных образцах в колбу, содержащую навеску образца (100 г), вводили 300 мл 0.01 н NaOH. Суспензию перемешивали 30 мин. Раствор отфильтровывали. Отбирали пробы по 2 мл, добавляли несколько капель 0.2% раствора метилового красного в метаноле. Титровали пробы 0.01н HCl. Количество поверхностных сульфогрупп (μ) рассчитывали по формуле:

$$n(SO_3H) = \frac{V(NaOH)}{m_{\text{кремнезема}}} \cdot \left(C_0(NaOH) - \frac{C_0(HCl) \cdot V(HCl)}{V_{\text{пробы}}} \right).$$

С целью качественного определения наличия поверхностных сульфогрупп к исследуемым навескам добавляли концентрированную азотную кислоту. Нагревали навески на водяной бане, а затем разбавляли раствор водой. Наличие сульфогрупп определяли по образованию объёмного осадка $BaSO_4$ после добавления раствора хлорида бария.

2.8.12. Получение ПСК-ПАНИ-модифицированных кремнеземных сорбентов. С целью перевода *изо*- или *тере*-ПСК из солевой формы в H^+ -форму 0.5 г ПСК в Na^+ -форме растворяли в 100 мл дистиллированной воды и пропускали через ионообменную колонку с Dowex. Полученные фракции объединяли, количество сульфогрупп определяли титрованием.

С целью получения интерполимерных комплексов ПСК-ПАНИ полимеризацию анилина (0.5 ммоль/г носителя) проводили при комнатной температуре при перемешивании, беря анилин и ПСА (*тере*-ПСК или *изо*-ПСК) в эквимолярном отношении (в пересчете на сульфогруппы). Для этого к 25 мл водного 1 %-ного раствора ПСК (6.9 г в 100 мл воды) добавляли 45 мкл анилина. После растворения анилина добавляли водный раствор ПСА (25 мл).

С целью модифицирования силанированного кремнезема поликомплексами *тере*-ПСК-ПАНИ и *изо*-ПСК-ПАНИ к предварительно высушенным под вакуумом в течение 30 мин навескам носителя (1 г; 2.5 г; 10 г) добавляли по 5, 25 и 50 мл полученного водного раствора поликомплекса ПСК-ПАНИ, соответственно. Суспензии перемешивали в течение 2 ч.

Синтез ПСК-ПАНИ-модифицированных сорбентов в присутствии кремнеземного носителя с иммобилизованным ПСК-покрытием проводили при комнатной температуре. Смешивали водный раствор анилина ($4.2 \cdot 10^{-4}$ моль/г_{носителя}) в присутствии соляной кислоты ($3.78 \cdot 10^{-4}$ моль/г_{носителя}) с водным раствором ПСА (0.154 г/г_{носителя}). Мольное соотношение соляной кислоты и анилина в реакционной смеси составляло 0.9:1, а анилина и окислителя – 1:1. ПСК-кремнезем (0.807 г) предварительно сушили в вакууме 30 мин. Затем в реактор подавали водный раствор мономера. Носитель инкубировали в этом растворе в течение 10 мин и вводили 25 мл водного раствора ПСА. Полимеризацию проводили при перемешивании в течение 80 мин. Реакцию останавливали, добавляя в реактор 100 мл 1 М водного раствора аммиака. Сорбент промывали водой на воронке с фильтром до нейтрального значения рН и отсутствия поглощения в диапазоне длин волн 200 - 700 нм. Затем сорбент

выдерживали в 50% водном метаноле 12 ч, отмывали водой до отсутствия поглощения в УФ- и видимой области спектра и сушили в вакууме до стабилизации веса. Силаминированный кремнезем модифицировали следующими интерполимерными комплексами *изо*-ПСК-ПАНИ: с соотношением анилиновых звеньев и кислотных звеньев в составе ПСК, равном 1:1 и с содержанием свободных сульфогрупп 25 % или 60 %, а также с соотношением звеньев 4:1 и с содержанием свободных сульфогрупп 86 %. К навескам носителя (по 0.2 г) добавляли по 2.11, 2.23 или 2.57 мл водных растворов указанных поликомплексов *изо*-ПСК-ПАНИ, соответственно. Полученные суспензии непрерывно перемешивали, каждые 10 мин отбирали пробы для спектрофотометрического определения содержания ПСК в суспензионной среде с целью построения кинетических кривых сорбции поликомплексов на поверхности носителя.

2.9. Модифицирование стеклянных мультикапилляров (МК) нанослоями ПАНИ

Для модификации МК ПАНИ-покрытием предварительно готовили стоковые растворы анилина в 1М HCl (мольное соотношение анилин:HCl = 1:3) и персульфата аммония в воде (0.18 г/мл). Для модификации одного МК длиной 30 см в пластиковой микропробирке (2 мл) смешивали 100 мкл раствора анилина, 50 мкл раствора ПСА и 1350 мкл воды (Milli Q). МК подсоединяли к перистальтическому насосу и набирали реакционную смесь (время наполнения МК составляло 30 - 40 с), при этом МК был закреплен в вертикальном положении. После заполнения капилляра реакционной смесью насос отключали, МК отсоединяли от шланга и инкубировали 20 мин при температуре 23 ± 1 °C в горизонтальном положении. По окончании полимеризации с помощью шприца из капилляра выдавливали реакционную смесь, МК продували воздухом также с помощью шприца и подсоединяли к насосу для промывки водой. Промывку МК проводили по схеме: вода (25 мл) – воздух – вода (25 мл), затем из капилляра удаляли остатки воды с помощью шприца и высушивали в сушильном шкафу при 80 °C в течение 4 ч.

2.10. Модифицирование полимерных синтетических мембран нанослоями ПАНИ и сборка БЭ, содержащих мембранный сорбент

Лист мембраны помещали в стеклянную или пластиковую ванну с ровным дном и добавляли половину подготовленного непосредственно перед модификацией

водного раствора анилина и соляной кислоты. Раствор готовили, отбирая реагенты из тары производителя в стеклянный лабораторный стакан с помощью механических дозаторов с одноразовыми наконечниками. Полученную смесь инкубировали 15 мин при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере при 25 °С. Затем к реакционной смеси добавляли необходимый объем приготовленного непосредственно перед модификацией водного раствора персульфата аммония. Через 15 мин после начала полимеризации лист мембраны переносили во вторую ванну с раствором анилина и соляной кислоты (вторая половина объема рабочего раствора). Полимеризацию проводили при комнатной температуре до приобретения мембраной темно-синего цвета. Затем лист переносили в чистую ванну с дистиллированной водой и отмывали поверхность мембраны от несвязанных частиц анилина при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере с периодической сменой дистиллированной воды в ванне, контролируя степень отмывки путем измерения поглощения промывочной воды на спектрофотометре.

Мембрану обрабатывали указанным способом 1 – 3 раза, после чего последовательно отмывали этанолом и водой. Финальную отмывку полученного материала продолжали до отсутствия поглощения водного смыва в УФ-области. Отмытую мембрану растягивали с помощью подходящих прищепок или иных устройств на деревянной рамке и высушивали до постоянной массы при комнатной температуре. Полученный лист мембранного сорбента хранили в плотно закрытой стеклянной или полиэтиленовой таре до дальнейшего использования или нарезали на единичные ленты размером 1 x 12 см². Единичный образец (площадь 12 см²) скручивали и помещали в пластиковый картридж. Картридж закрывали крышкой и упаковывали в стерильных условиях в плотную полиэтиленовую тару.

Критерием оценки химической стойкости полученного полимерного покрытия, распределенного по поверхности мембраны, являлось отсутствие поглощения фильтрата в диапазоне длин волн от 200 нм до 700 нм, полученного при пропускании через картридж 300 мкл буферного раствора, получаемого при смешивании 250 мкл 1М Трис HCl pH 8.0, 250 мкл 1М хлорида магния, 500 мкл Triton X 100 и 5.48 г сахарозы, после доведения конечного объема до 50 мл деионизованной водой. Измерение поглощения проводили против указанного буферного раствора.

2.11. Получение сополимеров 3-АБК-ПАНИ

ПАНИ-3-АБК получали окислительной сополимеризацией анилина с 3-АБК в 1 М HCl при перемешивании при 55 °С в течение 20 мин. Молярное соотношение

(смесь сомономеров):кислота:окислитель составляло 1:8:1. Затем к смеси добавляли 5-кратный объем ледяной воды. Продукт отфильтровывали, промывали 1 М HCl и водой до нейтрального значения pH фильтрата и высушивали в вакууме. Полимер осаждали 96 %-ной серной кислотой, промывали водой до pH 7.25 и сушили в вакууме. Выход продукта составлял 40 ~ 60%. Сомомеры брали в соотношениях анилин:3-АБК, равных 3:1, 1:1 и 1:3.

Поверхность кремниевых пластин (чипов) размером 70 x 8 x 0.5 мм окисляли, выдерживая их при 1000 °С в течение 4 ч в токе воздуха или кислорода. Затем поверхность как окисленных, так и не окисленных кремниевых пластин модифицировали полученными сополимерами. С этой целью нерастворимые сополимеры (см. подраздел 5.5) суспендировали (25 мг/мл) в ТГФ, а растворимые растворяли в ТГФ (получая 5 %-ные растворы). Из суспензий или из растворов на поверхность кремниевых пластин высаживали полимерные покрытия (от 1 до 3-х слоев) в процессе высушивания пластин в токе горячего воздуха.

Модифицирование кремниевых пластин ПАНИ проводили в процессе осадительной окислительной полимеризации анилина на поверхности пластин при комнатной температуре при молярном соотношении анилин:кислота:окислитель, равном 1:3:1, в течение 30 мин. Модифицированные пластины промывали водой, метанолом и сушили в токе горячего воздуха.

С целью силанирования поверхности кремниевых пластин последние выдерживали в кипящей воде в течение 16 ч, затем помещали в 5 %-ный водный раствор γ -АПТЭС на 30 мин. Полученные пластины промывали водой до нейтрального значения pH смывов, и сушили под струей горячего воздуха.

2.12. Оценка гидролитической стабильности сорбентов

Гидролитическую стабильность образцов всех полученных композитов и соответствующих носителей оценивали в условиях щелочного гидролиза. С этой целью одинаковые по массе навески образцов помещали в пробирки и инкубировали их в 70 %-ном водном метаноле в течение 24 ч, затем добавляли равный объем буферного раствора (pH 9.5), содержащего 0.025 М борат натрия и 0.1 М гидроксид натрия. Частицы образца осаждали, центрифугируя пробирки в течение 1 мин при 3000 об/мин; супернатант удаляли, затем вновь добавляли буферный раствор до получения 10 %-ной суспензии сорбента (по массе) и инкубировали образцы в этом растворе при комнатной температуре в течение, по крайней мере, 8 ч. Каждый час

отбирали аликвоту суспензии, к которой добавляли раствор 0.05 М молибдата натрия, подкисленный серной кислотой (1/200 от объема раствора молибдата натрия), суспензию перемешивали 10 мин. После осаждения частиц отбирали аликвоты надосадочной жидкости и определяли концентрацию образующейся кремниймолибденовой кислоты по интенсивности оптического поглощения при 320 нм. (Кремниймолибденовая кислота образуется в указанных условиях в соответствии с уравнением реакции: $\text{H}_2\text{SiO}_3 + 12\text{Na}_2\text{MoO}_4 + 12\text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow \text{H}_4[\text{Si}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4] + 12\text{Na}_2\text{SO}_4 + 11\text{H}_2\text{O}$).

2.13. Ртутная порометрия

Ртутную порометрию образцов использованных носителей и полученных композиционных сорбентов проводили на установке «*Pore Sizer 9300*» (Micromeretics, США). Тестируемый образец (0.15 - 0.3 г) помещали в чашку пенетрометра, представляющего собой полый открытый с обоих концов стеклянный стержень, один из концов которого выполнен в виде герметично закрывающейся чашки, а внешняя поверхность стержня металлизирована. Сначала пенетромтр с образцом устанавливали в порометр и вакуумировали, а затем приводили в контакт с металлической ртутью (содержащейся в специальном блоке порометра), увеличивая давление в системе. Под действием атмосферного давления ртуть заполняла внутренний стержень пенетрометра и объем чашки, свободный от частиц сорбента. Затем заполненный ртутью пенетромтр с образцом закрепляли в герметичном отсеке порометра, заполненного особой гидравлической жидкостью, и с помощью электромеханического поршня посредством гидравлической жидкости прикладывали нарастающее давление к открытому концу пенетрометра. При этом ртуть вдавливалась в поры образца, в то время как внутренний объем стержня пенетрометра (столбик ртути) пропорционально уменьшался. Заполненный ртутью пенетромтр представляет собой конденсатор, «обкладками» которого являются внешняя металлическая поверхность стержня и поверхность столбика ртути внутри стержня. Изменение электрической емкости такого конденсатора соответствует объему ртути, проникающей под приложенным давлением в поры образца. С целью построения порограмм для определения численных значений среднего эффективного диаметра и удельного объема пор образца использовали алгоритм расчета, разработанный в лаборатории "Полимеры для биологии" ИБХ РАН [137]. Зависимости объема вдавленной ртути при данном давлении от диаметра пор одновременно представляли

в виде интегральных кривых вдавливания ртути и в виде дифференциальных кривых распределения пор по эффективным диаметрам.

2.14. Определение элементного состава образцов сорбентов

Элементный состав образцов сорбентов определяли методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) на электронном спектрометре Kratos AXIS Ultra DLD (Kratos Analytical, Великобритания) с источником монохроматизированного рентгеновского излучения Al K α ($h\nu = 1486.6$ эВ). Анализируемая площадь образца составляла 0.3×0.7 см², энергия пропускания - 40 эВ для обзорных спектров и линий низкой интенсивности, 20 эВ - для линий высокой интенсивности; время накопления на точку составляло 0.1 с для отдельных линий элементов и 0.3 с для обзорных спектров (за 1 прохождение). Диапазон энергий связи составлял $\pm 10 - 15$ эВ относительно положения максимума пика. Шаг измерения составлял 0.05 эВ для спектров отдельных линий элементов (0.1 эВ для линий со сдвигом из-за зарядки) и 0.5 эВ - для обзорных спектров. Давление в камере анализа спектрометра составляло от $\sim 10^{-7}$ до $\sim 10^{-8}$ Па. Для борьбы с явлениями зарядки использовали электронную пушку-нейтрализатор. Зарядку образцов корректировали по отношению к энергии связи линии C 1s для внутреннего углеводородного алифатического стандарта 284.5 эВ, либо к линии Au 4f золотой подложки с энергией связи 84.0 эВ.

База данных TPP-2M (программа QUASES - IMFP), используемая при обработке результатов РФЭС, не содержит информацию об исследуемых полимерах, однако при подстановке кинетических энергий для более простых полимеров ранее была выявлена зависимость СДСП от кинетической энергии, выражающаяся как: $\lambda \sim E_K^{0.7-0.75}$. Поэтому в качестве второго делителя для интенсивности использовали кинетическую энергию линии в указанной степени.

Необходимые для исследования образцы получали, нанося методом «кастинга» равномерно распределенный слой полимера из соответствующего раствора на поверхность ситалловой подложки с золотым покрытием. Для получения образцов покрытий растворы полимеров (5 мкл, 0.4 мг/мл) в тетрагидрофуране (РА1, РА7, РА8, РА11) или в ацетоне (фторопласт 42Л) наносили на ситалловые подложки с золотым покрытием и высушивали в нормальных условиях. ПАНИ-покрытия наносили на подложки в результате проведения полимеризации анилина в водном растворе HCl с использованием ПСА в качестве окислителя при соотношении

мономер:допант:окислитель, равном 1:3:1. Полученные ПАНИ-покрытия выдерживали 10 мин в водном растворе аммиака, отмывали водой и высушивали.

Спектры РФЭС получали в сверхвысоком вакууме, облучая исследуемый материал пучком рентгеновских лучей и регистрируя зависимость количества испускаемых в результате этого воздействия электронов от их кинетической энергии. Анализируемая площадь образца составляла 700 x 300 мкм. Образцы прикрепляли к держателю и анализировали при давлении ниже $1 \cdot 10^{-7}$ Па. Следует отметить, что регистрируемые электроны испускаются верхним слоем исследуемого материала толщиной не более 1 - 10 нм.

2.15. Протокол лизиса бактериальных культур, урогенитальных мазков и мокроты

С целью проведения лизиса «простых» образцов использовали лизирующие буферные растворы *ЛБ1* и *ЛБ2*.

Для приготовления раствора *ЛБ1* смешивали 1 мл 1М Трис·НСl (рН 8.0), 2 мл 0.1 М хлорида кальция и 2 мл 20 %-ной сахарозы (либо добавляли 400 мг сухой сахарозы). К смеси также добавляли 20 мг лизоцима (либо смеси лизоцима и лизостафина, по 10 мг каждого фермента). После растворения ферментов объем доводили водой (Milli Q) до 10 мл.

Для приготовления раствора *ЛБ2* смешивали 1 мл 1 %-ного Тритон X-100 и 100 мкл 0.5М ЭДТА (рН 8.0). Объем доводили водой (Milli Q) до 10 мл.

Лизис образцов с целью выделения бактериальной ДНК проводили следующим образом. К 50 мкл образца* добавляли 100 мкл *ЛБ1* и 20 мкл 3 %-ного раствора протеиназы К. Смесь перемешивали 5 - 10 с и инкубировали при 60 °С в течение 10 мин. Затем к смеси добавляли 100 мкл *ЛБ2*, перемешивали 5 сек и повторно инкубировали в течение 10 мин при 60 °С.

**При выделении ДНК из бактериальных культур использовали образцы, содержащие 10^9 клеток/мл.*

2.16. Протокол лизиса образцов цельной крови человека и млекопитающих

С целью проведения лизиса образцов цельной крови использовали лизирующие буферные растворы *В1*, *В2* и *ВВ*.

Для приготовления раствора *B1* смешивали 250 мкл 1М Трис·НСl (рН 8.0), 250 мкл 1 М хлорида магния, 500 мкл Тритона X-100 и добавляли 5.48 г сахарозы. Объем доводили водой (Milli Q) до 50 мл.

Для приготовления раствора *B2* смешивали 5 мл 1М Трис·НСl (рН 8.0), 500 мкл 0.5 М ЭДТА (рН 8.0), 2 мл 5 М хлорида натрия и добавляли 100 мг ДСН. Объем доводили водой (Milli Q) до 50 мл.

Для приготовления раствора *BВ* смешивали 4.94 мл 1М Трис·НСl (рН 8.0), 60 мкл Тритона X-100 и добавляли 40 мг сахарозы.

С целью лизиса образцов цельной крови (человека или млекопитающих) в пластиковую пробирку (объемом 2 мл) вносили 100 мкл венозной крови (предварительно отобранной у донора в герметично закрывающиеся пластиковые пробирки объемом 15 мл, содержащие по 1 мл 0.05 М водного раствора ЭДТА-Na₂) и добавляли 100 мкл буферного раствора *BВ*. Смесь перемешивали на лабораторном встряхивателе 5 с, инкубировали 15 мин при 95 °С и центрифугировали 10 мин при 3.354 *kg*. Для выделения ДНК использовали полученную надосадочную жидкость.

2.17. Протокол лизиса цельной крови с целью выделения лейкоцитарной ДНК

В пластиковую пробирку (объемом 2 мл) вносили 250 мкл венозной крови (предварительно отобранной у донора в герметично закрывающиеся пластиковые пробирки объемом 15 мл, содержащие по 1 мл 0.05 М водного раствора ЭДТА-Na₂) и добавляли 1250 мкл буферного раствора *B1*. Смесь перемешивали на лабораторном встряхивателе 5 с, инкубировали 30 мин при комнатной температуре и центрифугировали 10 мин при 0.134 *kg*. Надосадочную жидкость аккуратно удаляли. К полученному осадку добавляли 60 мкл раствора *B2*, тщательно перемешивали и инкубировали 15 мин при 55 °С. Полученный лизат использовали для выделения ДНК.

2.18. Протоколы лизиса тканей растений и грибов

Протокол 1. Перед выделением ДНК из листьев их предварительно промывали 70% этанолом, затем дистиллированной водой. 10 г нарезанных листьев (небольшими кусочками, ~ 5 x 5 мм) помещали в предварительно охлажденную фарфоровую ступку и заливали жидким азотом, затем растирали пестиком. (При отсутствии жидкого азота допускается использование заранее замороженных при -20 °С листьев). Полученный

гомогенат помещали в пробирку, добавляли 10 мл горячего (95 °С) буфера для экстракции (50 mM Трис·HCl, pH 8; 0.7 M NaCl; 10 mM ЭДТА; 20 mM 2-меркаптоэтанол), перемешивали и инкубировали 20 мин при 56 °С. К 200 мкл полученного экстракта добавляли 100 мкл лизирующего раствора ЛБ1 и 20 мкл 3 %-ного раствора протеиназы К. Смесь перемешивали на встряхивателе 5 - 10 с и инкубировали при 60 °С в течение 10 мин. Затем к смеси добавляли 100 мкл раствора ЛБ2, перемешивали на встряхивателе 5 с и повторно инкубировали 10 - 15 мин при 60 °С. Из полученного лизата выделяли ДНК.

Протокол 2. Для проведения исследования листья или стебли (кусочки ~ 5 x 5 мм), измельчали и растирали до состояния гомогенной кашицы, после чего переносили в микропробирки (объемом 2 мл) и добавляли 100 мкл 0.005 %-ного раствора ДСН и 25 мкл 3 %-ного водного раствора протеиназы К. Инкубировали 20 мин при 60 °С. Из полученного лизата выделяли ДНК.

Протокол 3. С целью выделения ДНК из семян использовали измельченное или цельное зерно озимой пшеницы («Московская-39») урожая 2014 г., хранившиеся при +4 °С. В микропробирки (объемом 2 мл) вносили по 25 мг измельченного зерна или по 100 мг цельных семян и добавляли 150 мкл 0.005 %-ного раствора ДСН и 25 мкл 3 %-ной протеиназы К. Инкубировали 30 мин при 60 °С. Из полученного лизата выделяли ДНК.

Протокол 4. С целью выделения ДНК из грибного мицелия (использовали аскомицетовые грибы рода *Fusarium*) образец мицелия (~ 5 x 5 мм) переносили в микропробирки (объемом 2 мл) и добавляли 100 мкл 0.005 %-ного раствора ДСН и 25 мкл 3 %-ной протеиназы К. Инкубировали 20 мин при 60 °С. Из полученного лизата выделяли ДНК.

2.19. Протокол лизиса компонентов почвы

Использовали образцы курского чернозема. Образец почвы (~ 300 мг) растирали, удаляли растительные остатки и переносили в микропробирки (объемом 2 мл), в которые добавляли 500 мкл 0.005 %-ного раствора ДСН и 25 мкл 3 %-ного водного раствора протеиназы К. Суспензию инкубировали 30 мин при 52 – 60 °С, затем центрифугировали при 1.207 kg и отбирали надосадочную жидкость, из которой затем выделяли ДНК.

2.20. Протоколы выделения ДНК с помощью БЭ, содержащих разработанные полимерсодержащие сорбенты

50 – 100 мкл лизата (см. п. 2.15) наносили на картридж (на предварительно смоченный слой сорбента). Картриджи инкубировали 2.5 – 3 мин при комнатной температуре. Для смачивания (уравновешивания) сорбента на вставленный в сборник картридж с сорбентом наносили 300 мкл воды и центрифугировали картридж (вместе со сборником) при 0.134 *kg* 1 мин. При выделении ДНК следует использовать сорбент, увлажненный не позднее, чем за 15 мин до нанесения лизата. В некоторых случаях лизат наносили на сухой сорбент (соответствующие комментарии приведены в Главе 5).

При выделении “*batch*”-методом в пластиковую пробирку (объемом 1.5 – 2.0 мл) вносили 100 мг тестируемого сорбента, добавляли 200 мкл ТЭ-буферного раствора (рН 8.2) и вносили в полученную суспензию 50 мкл лизата. Пробирку встряхивали 3 мин при комнатной температуре и центрифугировали при 0.134 *kg* 1 мин. Для выделения ДНК использовали полученную надосадочную жидкость.

При выделении ДНК с помощью мембранного сорбента 20 - 50 мкл лизата наносили на предварительно увлажненную водой ПАНИ-модифицированную скрученную мембрану, помещенную в БЭ (мембрану увлажняли тем же способом, как и дисперсный сорбент). БЭ выдерживали при комнатной температуре в течение 3 мин, а затем центрифугировали при 0.134 *kg* 1 мин. В некоторых случаях лизат наносили на сухой мембранный сорбент (соответствующие комментарии приведены в Главе 5).

При выделении суммарной ДНК из образцов почвы использовали картридж, содержащий 100 мг ФП-ПАНИ-сорбента и 50 мг полиальгинатных микросфер. Картридж предварительно уравновешивали (смачивали) 500 мкл воды. Избыток воды удаляли, центрифугируя колонки 2 мин при 0.134 *kg*. На колонку наносили 100 мкл лизата, инкубировали 2 мин при комнатной температуре, а затем центрифугировали 2 мин при 0.134 *kg*.

При выделении ДНК с помощью ПАНИ-модифицированных МК проводили манипуляции, описанные в Главе 5 (п. 5.1.1.).

На картриджи с полимермодифицированным кремнеземом рекомендуется наносить 50 - 100 мкл образца (лизата), на колонки с полимермодифицированными мембранами – не более 20 - 50 мкл лизата. Объем лизата при выделении ДНК с помощью ПАНИ-модифицированных МК зависит от геометрических характеристик используемого МК-наконечника (см. п. 4.2.1.).

Электрофорез полученных ДНК-содержащих элюатов проводили с использованием прибора ROTH (BioRad, США) в 0.8 - 1% агарозном геле при постоянной силе тока 90 мА в течение 20 - 30 мин.

2.21. Полимеразная цепная реакция

ПЦР фрагментов выделенной ДНК проводили с использованием термоциклера «Терцик 4» («НПФ ДНК-Технология», Россия) в 35 мкл реакционной смеси, содержащей 3.5 мкл 10х-буферного раствора (750 мкл 1 мМ Трис-НСl, рН 8.8, 200 мкл 1 мМ сульфат аммония, 0.1 %-ный Твин-20), добавляли 1 мМ каждого dNTP, 12.5 пмоль праймеров, 3.5 пмоль зондов, 2.5 ед. *Taq*-полимеразы и 5 мкл раствора ДНК, выделенной с помощью разработанных сорбентов. При ПЦР фрагментов бактериальной ДНК использовали праймеры: 10-30 f / Pr vu 3r, 10-30 f / Es co 3r, 10-30 f / Bam su 1r, 10-30 f / Sa tu 2r, 10-30 f / St au 1r, 10-30 f / La ba 1r, 10-30 f / Yl en 2r, 10-30 r / Li mo 2r. Условия проведения ПЦР (если требовалось специальное уточнение) указаны в соответствующих подразделах Главы 5 диссертации.

ПЦР фрагментов ДНК, выделенной из образцов почвы, проводили на детектирующем амплификаторе Applied Biosystems™ 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems, США) с использованием набора resDNASEQ™ Quantitative CHO DNA Kit (Applied Biosystems, США).

При проведении исследований в рамках выполнения двусторонних договоров и международных проектов серии картриджей с разработанными кремнеземными или мембранными сорбентами поступали на испытания в ПЦР-лаборатории отечественных государственных организаций и компаний (ФГБУ НМИЦ Гематологии Минздрава России, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, ФКУЗ РосНИПЧИ Роспотребнадзора МИКРОБ, «НПФ ДНК-Технология», ЗАО «НПФ Синтол», ООО «НПФ Генлаб», ООО «Амбер»), а также в ряд иностранных компаний (Mira-Diagnostica GmbH, NextTec GmbH, Agrobiogen GmbH, Proligo Biochemie GmbH). Испытания переданных картриджей в указанных организациях проводились в соответствии с утвержденными в них методиками и протоколами.

Как правило, результаты ПЦР анализировали, проводя электрофорез в 2.5 %-ном агарозном геле и визуализировали после окрашивания геля бромидом этидия в трансиллюминаторах ECH-15-M, Vilber-Lourmat (Франция) или BioDoc It™ System, UVP (США). Для иных случаев в Главе 5 приведены соответствующие уточнения.

Результаты ПЦР в формате FLASH анализировали с помощью флуоресцентного детектора «Джин» («НПФ ДНК-Технология», Россия). ПЦР в реальном времени проводили с помощью амплификатора "ДТ-96" («НПФ ДНК-Технология», Россия). Зонд *TaqMan* использовали в концентрации 0.2 пмоль/мкл.

2.22. Очистка ПЦР-фрагментов

С целью сравнительной оценки эффективности применения разработанных сорбентов для очистки ПЦР-фрагментов проводили следующие тесты.

2.22.1. Удерживание *Taq*-полимеразы. Готовили раствор *Taq*-полимеразы в буфере для ПЦР с $A_{280} = 0.1$ ОЕ. Затем 50 мкл (4.25 мкг белка) этого раствора наносили на картриджи, заполненные сравниваемыми сорбентами. Оптическое поглощение элюатов измеряли при 280 нм.

2.22.2. Сорбция дНТФ. Готовили растворы 70 мМ дНТФ (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ) и 30 мМ FAM-дУТФ добавляли к реакционной смеси после завершения ПЦР. Флуоресценцию определяли с помощью флуориметра «Джин» («НПФ ДНК-Технология», Россия). Фоновый сигнал использовался как единица измерения.

2.22.3. Удерживание флуорофоров и олигонуклеотидов. В качестве ДНК-матрицы при проведении ПЦР использовали фрагмент молекулы ДНК длиной 560 п.н. (раствор внутреннего стандарта). Праймеры для внутреннего контроля и HEX-меченный зонд использовали в концентрации 0.33 пМ/мкл. В результате ПЦР зонд разрушается, что приводит к высвобождению красителя (HEX). После завершения ПЦР к реакционной смеси добавляли FAM-меченный олигонуклеотид (FAM-AGC CGG GCG CGG TGG C, 1 пМ/мкл). Полученную смесь пропускали через картриджи с разработанными сорбентами и собирали элюаты. Исходные смеси и элюаты разбавляли в 10, 50 и 100 раз, флуоресценцию исходных и разбавленных образцов измеряли на флуориметре «Джин» («НПФ ДНК-Технология», Россия).

2.23. Разделение смесей он- и днДНК

При выявлении условий, позволяющих разделять компоненты смесей, содержащих он- и днДНК, получали модельную смесь, содержащую геномную ДНК из *Agrobacterium tumefaciens* C58 (днДНК) и кДНК, полученную на основе мРНК вируса табачной мозаики (онДНК). Смешивали по 100 мкл растворов гексамерного праймера со случайной последовательностью (0.5 нг/мкл) и обратной транскриптазы

RevertAid™ M-MuLV (Fermentas, США) (0.5 нг/мкл). 50 мкл полученной смеси наносили на картридж с разработанным сорбентом. Полученный после центрифугирования картриджа элюат тестировали методом ПЦР в реальном времени с использованием амплификатора "ДТ-96" («НПФ ДНК-Технология», Россия).

2.24. Определение белка методом Бредфорда

К 50 мкл пробы добавляли 250 мкл холодного раствора Бредфорда (0.04 %-ный раствор Кумасси бриллиантового синего G-250 в смеси изопропанол:этанол:уксусная кислота:вода, взятых в объемном соотношении 2:1:1:6), хорошо перемешивали. Не ранее, чем через 5 мин после добавления красителя измеряли поглощение при длине волны 595 нм.

2.25. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ)

Электрофорез выделяемых белковых фракций проводили в градиентном (4 – 30 %) ПААГ в присутствии 0.1 %-ного ДСН на установке PowerPac™ HC High-Current Power Supply (BioRad, США) при постоянной силе тока 60 мА в течении 40 мин. Гель окрашивали 0.125 %-ным раствором Бредфорда (см. п. 2.24).

Электрофорез фракций гуминовых веществ проводили на устройстве PowerPac™ HC High-Current Power Supply (BioRad, США) в 10% ПААГ при постоянной силе тока 50 мА в течение 30 мин.

2.26. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Условия ВЭЖХ-разделения компонентов биологических смесей с помощью ВЭЖХ-колонок с разработанными сорбентами приведены в Главах 3 и 5 (в частности, в подписях к соответствующим рисункам).

ВЭЖХ образцов лизата и элюатов проводили на ВЭЖХ-системе Flexar (PerkinElmer Instruments, США) с УФ-детектором, используя SGX C-18 колонку (8 x 250 мм; 7 мкм) для обращенно-фазовой хроматографии. Исследование проводили при скорости потока 1 мл/мин. Колонку элюировали водой в течение 12.5 мин, затем линейным градиентом ацетонитрила (0 – 100% за 24 мин). Объем каждой пробы составлял 10 мкл. Поглощение измеряли при 260 нм.

При оценке качества выделения суммарной ДНК из образцов почвы использовали ВЭЖХ-систему Dionex UltiMate 3000 (ThermoFisher Scientific, США). Анализ проводили в обращено-фазовом режиме на колонках YMC-Pack C4 100 x 4.6 мм (YMC Inc., Япония) и YMC-Pack C18 100 x 4.6 мм (YMC Inc., Япония) в условиях градиентного элюирования. Элюент А - вода очищенная (Direct Q-5, Millipore, США). Элюент В - 100% ацетонитрил (PanReac AppliChem ITW Reagents, Германия). Объем вводимой пробы - 50 мкл. Данные получали с использованием детектора с диодной матрицей при скорости потока 1 мл/мин. Состав подвижной фазы: 0 - 2 мин – 100 % элюента А; 2 - 8 мин – 0 – 100 % элюента В; 8- 11 мин – 100 % элюента В; 11- 15 мин – 100 % элюента А.

2.27. Получение полиальгинатных сфер

Полиальгинатные сферы получали капельным методом, вводя 1 %-ный раствор альгината натрия в 1М раствор хлорида кальция. Сформированные сферы переносили в 96% раствор этанола и инкубировали 2 ч. Полученные сферы сушили в сушильном шкафу при 35°C в течение 24 ч.

2.28. Протокол выделения витаминов (витамеров) из цельной крови

1. 10 мл венозной крови отбирали в герметично закрывающиеся пластиковые пробирки (объемом 15 мл), содержащие по 1 мл 0.05 М водного раствора ЭДТА- Na_2 и перемешивали, несколько раз встряхивая и переворачивая закрытую пробирку.

2. Полученный препарат крови с консервантом (ЭДТА- Na_2) немедленно замораживали при -18 °С. Замороженную кровь можно хранить не более 1 мес, а также транспортировать в охлаждаемом контейнере, обеспечивая при этом температуру не выше -4 °С. В случае, если было допущено размораживание крови, ее следует немедленно подвергнуть обработке в соответствии с требованиями настоящей методики или утилизировать.

3. Непосредственно перед подготовкой пробы к анализу пробирку с законсервированной кровью размораживали, выдерживая 15 – 20 минут при комнатной температуре (18 – 24 °С). Свежеотобранную кровь можно готовить к анализу непосредственно. Кровь, содержащую консервант, переносили в герметично закрывающуюся пластиковую пробирку объемом 50 мл. С помощью пипетки

добавляли в пробирку с кровью 30 мл ацетонитрила. Первые 5 мл ацетонитрила добавляли непосредственно в слой крови, порциями по 1 мл, добиваясь перемешивания крови струей растворителя. Последующие 25 мл ацетонитрила доливали одной порцией. Пробирку тщательно закрывали и перемешивали в течение 1 мин.

4. Пробирку открывали, сгусток аккуратно удаляли одноразовой пластиковой пипеткой, наматывая его на пипетку и снимая оставшуюся массу осажденных компонентов крови со стенок пробирки. Пипетку со сгустком утилизировали. Иногда (в силу индивидуальных особенностей организма пациента или в результате длительного хранения) наблюдали образование темно-окрашенного дисперсного осадка, а не сгустка. Для удаления осадка рекомендуется центрифугировать пробирку с образцом при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученный супернатант переливали и использовали для дальнейшей обработки.

5. Полученную смесь сыворотки с ацетонитрилом (~ 25 мл) концентрировали до объема ~ 0.5 мл на вакуумируемой центрифуге при 0.67 *kg*.

6. К сыворотке добавляли двукратный объем *n*-гексана (~ 1.6 мл) и плотно закрывали пробирку. Для экстрагирования жирорастворимых витаминов в органическую фазу пробирку помещали на 75 мин на планетарную мешалку под углом 30 – 40 ° (между осью пробирки и горизонталью).

7. По окончании экстракции пробирку оставляли в покое при комнатной температуре на 5 мин для расслаивания водной (нижней) и гексановой (верхней) фаз.

8. Нижнюю (водную) фазу, содержащую водорастворимые производные витаминов, аккуратно отбирали с помощью пипетки, переносили в чистую центрифужную пробирку и упаривали на вакуумируемой центрифуге при 0.67 *kg* до остаточного объема 210 ± 10 мкл.

9. Оставшуюся в исходной пробирке гексановую фракцию, содержащую жирорастворимые витамины, также упаривали на вакуумируемой центрифуге (при 0.67 *kg*) до остаточного объема 210 ± 10 мкл.

10. Для очистки полученной фракции, содержащей водорастворимые витамины, использовали картридж для твердофазной экстракции, содержащий 120 мг ФП-сорбента. Крышку картриджа, вставленного в пластиковый приемник, открывали и на верхний фильтр картриджа с помощью автоматической пипетки наносили весь объем полученного после концентрирования образца (см. п. 8), содержащего

водорастворимые витамины. После впитывания пробы в слой сорбента, картридж выдерживали при комнатной температуре 3 мин. Затем с помощью автоматической пипетки в картридж вносили 1.8 мл 30 %-ого водного раствора ацетонитрила, порциями по 600 мкл. При этом первую порцию элюента (600 мкл) добавляли в пробирку, из которой отбирали пробу, перемешивали и вносили в картридж. Затем добавляли остальные две порции элюента (по 600 мкл), следя за тем, чтобы элюат, содержащий водорастворимые витамины, стекал в приемник самотеком.

11. Фракцию, содержащую жирорастворимые витамины, также очищали с помощью картриджа для твердофазной экстракции, содержащего 120 мг ФП-сорбента. Крышку картриджа, вставленного в пластиковый приемник, открывали и на верхний фильтр картриджа с помощью автоматической пипетки наносили весь объем (200 ± 15 мкл) полученного после концентрирования образца (см. п. 8), содержащего жирорастворимые витамины. После впитывания пробы в слой сорбента, картридж выдерживали при комнатной температуре 3 мин. Затем с помощью автоматической пипетки в картридж вносили 1.8 мл метанола, порциями по 600 мкл. При этом первую порцию метанола (600 мкл) добавляли в пробирку, из которой затем отбирали пробу, перемешивали и вносили в картридж. Затем добавляли остальные две порции метанола (по 600 мкл), следя за тем, чтобы элюат, содержащий жирорастворимые витамины, стекал в приемник самотеком.

12. Полученные элюаты, содержащие очищенные фракции водо- и жирорастворимых витаминов, концентрировали на вакуумируемой центрифуге (при 0.67 kg) до остаточного объема 200 мкл, с помощью автоматической пипетки переносили в пластиковые пробирки с крышками объемом 1.5 или 2.0 мл. В случае, если объем сконцентрированной пробы составлял менее 200 мкл, пробы доводили до 200 мкл очищенной водой (в случае водорастворимых витаминов) или метанолом (в случае жирорастворимых витаминов).

13. Пробу для определения содержания водорастворимых витаминов готовили непосредственно перед проведением хроматографического анализа. Для этого в специальную стеклянную виалу (входит в набор расходных материалов к хроматографу) с помощью автоматической пипетки отбирали 25 мкл элюата, содержащего водорастворимые витамины и добавляли 175 мкл водного 0.4 М раствора перхлората лития (рН 3.5). Виалу помещали в штатив автодозатора и проводили хроматографический анализ в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя хроматографа.

14. Пробу для определения содержания жирорастворимых витаминов непосредственно переносили в стеклянную виалу (в объеме 200 мкл, без разбавления) при помощи автоматической пипетки. Виалу помещали в штатив автодозатора и проводили хроматографический анализ в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя хроматографа.

15. Хроматограф готовили к работе в соответствии с инструкцией по эксплуатации. Необходимые режимы работы устанавливали в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Рекомендуемые условия хроматографического анализа указаны в Таблице 2.1. Для конкретного типа колонки условия хроматографирования могут быть установлены экспериментально. После запуска прибора производили проверку технических характеристик, выполняя холостой опыт с использованием эталонных растворов (смесей).

В Таблицах 2.1 – 2.4 представлены условия проведения хроматографического анализа получаемых фракций и допустимые погрешности измерений.

Таблица 2.1 - Условия выполнения ВЭЖХ.

	Водорастворимые витамины	Жирорастворимые витамины
колонка	PerkinElmer Pecosphere RP C18 3 мкм, 80 x 4.5 мм. Предколонка PE NewGuard RP18, 7 мкм, 15 x 3.2 мм.	PerkinElmer Pecosphere RP C8 3 мкм, 80 x 4.5 мм. Предколонка PE NewGuard RP8, 7 мкм, 15 x 3.2 мм.
температура	26 °С	
детектирование	210 нм	270 нм
условия элюирования	А: ацетонитрил, В: 0.4 М LiClO ₄ , рН 3.5. Градиентное элюирование.	А: метанол, В: вода. Градиентное элюирование.
	1. 3.5 мин, В 100%, V 0.8 мл	1. 0.5 мин, В 50%, V 0.7 мл
	2. 15 мин, В 80 %, V 0.8 мл	2. 16 мин, А 100%, V 0.7 мл
	3. 3 мин, В 80%, V 2.0 мл	3. 2 мин, В 50%, V 1.0 мл
	4. 3 мин, В 100%, V 2.0 мл	4. 5 мин, В 50%, V 2.0 мл
	5. 1 мин, В 100%, V 1.0 мл	-

Таблица 2.2 - Концентрации витаминов в стандартных градуировочных растворах.

Водорастворимые витамины		Жирорастворимые витамины	
	Концентрация, мг/мл		Концентрация, мг/мл
С	2	А	1
В ₁	1.5	Д ₃	0.5
В ₅	1.5	Е	0.5
В ₆	0.5	К	0.5
В ₁₂	0.5		

Таблица 2.3 - Времена удерживания пиков и примерные пределы обнаружения (ПО) выделяемых витаминов.

Водорастворимые витамины			Жирорастворимые витамины		
	время, мин	ПО, мкг/мл		время, мин	ПО, мкг/мл
С	1.708	1	А	7.93	0.01
В ₁	9.88	0.1	Д ₃	9.05	0.001
В ₅	10.54	0.1	Е	9.43	0.1
В ₆	9.23	0.01	К	10.47	0.01
В ₁₂	18.05	0.01			

Таблица 2.4 - Погрешность измерений при ВЭЖХ-определении содержания витаминов в крови.

Витамин	Содержание в крови, мкг/мл	Относительная погрешность, % Р = 0.95
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
С	1-10	90
	10-100	65
В ₁	0.1-1	90
	1-10	65
В ₅	0.1-1	90
	1-10	65
В ₆	0.01-0.1	90
	0.1-1	65
В ₁₂	0.01-0.1	90
	0.1-1	65
А	0.01-0.1	90
	0.1-1	65

<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
D ₃	0.001-0.01	90
	0.01-1	65
E	0.1-1	90
	1-10	65
K	0.01-0.1	90
	0.1-1	65

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ СОРБЦИОННЫХ СВОЙСТВ ПОЛИАРАМИД-, ФТОРПОЛИМЕР- И ПАНИ-СОДЕРЖАЩИХ ПОКРЫТИЙ (обсуждение результатов)

Анализ публикаций (Глава 1), описывающих способы, материалы и устройства, предназначенные для выделения биополимеров из биологических образцов, приводит к очевидному выводу о том, что по сравнению с используемыми в настоящее время методами многостадийного выделения НК более перспективным представляется подход, обеспечивающий одностадийную процедуру выделения.

Иными словами, снизить потери выделяемой НК и увеличить степень ее очистки возможно благодаря использованию материалов, демонстрирующих эффект *«негативной селекции»* в отношении НК. Такие материалы должны проявлять особые сорбционные свойства. Впервые материалы (перфторполимеры), проявляющие подобные свойства, были описаны в работах Иэртена с сотр. в результате исследования взаимодействия частиц ПТФЭ с биополимерами [234, 235]. Тем не менее, понятие *«негативной селекции»* этими авторами введено не было. Также не были выявлены работы, в которых была практически реализована возможность одностадийного выделения НК из биологических образцов.

В основу настоящего исследования было 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 также (возможно) других синтетических полимеров.

Практической целью настоящего исследования являлась разработка эффективных способов одностадийного разделения компонентов биологических смесей, содержащих НК и белки, что, как предполагалось, возможно при использовании различных полимерсодержащих материалов, демонстрирующих указанный выше эффект. С этой целью было необходимо исследовать факторы, определяющие механизм сорбции биомакромолекул на поверхности исследуемых полимерных покрытий, в частности, оценить влияние морфологии и химического строения поверхностных слоев исследуемых покрытий.

3.1. Сходство и различия в сорбционных свойствах фторполимерных и ПАНИ-покрытий

Прежде, чем перейти к обсуждению результатов комплексного исследования сорбционных свойств фторполимер- и ПАНИ-содержащих сорбентов в отношении НК и белков, полезно проиллюстрировать наиболее общие свойства этих материалов на примере разделения компонентов смеси, содержащей ДНК, РНК и белки, а также рассмотреть условия разделения удерживаемых при этом компонентов белковой фракции.

Эффект «*негативной селекции*» в отношении НК легко проиллюстрировать примерами использования ВЭЖХ-колонок, упакованных ПТФЭ- и ПАНИ-содержащими кремнеземными сорбентами для разделения смеси плазмиды рBR 322 из *E. Coli*, РНК и сопутствующих белков. На Рисунке 1.6 (Глава 1) видно, 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. Мы показали, что аналогичный результат достигается при использовании ПАНИ-модифицированного кремнезема (Рисунок 3.1).

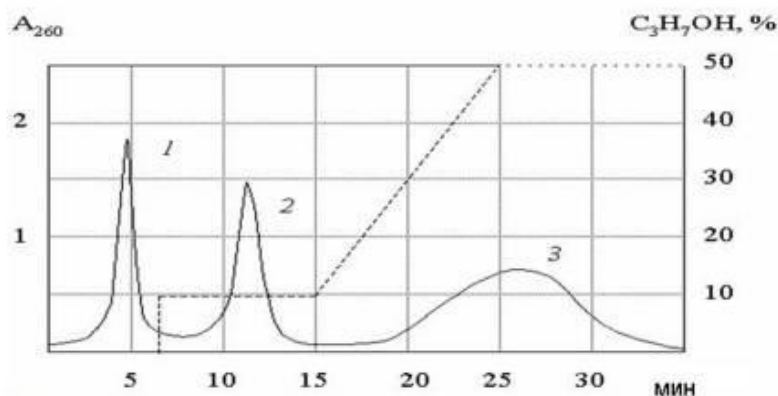


Рисунок 3.1 - Очистка плазмиды рBR322 от РНК и сопутствующих белков. Использовали стеклянную колонку (5 x 150 мм), упакованную МПС-1150-ПАНИ. Хроматографию проводили на ВЭЖХ-системе Beckman Coulter Model 338 (США). Элюент: 0.01М Tris-HCl (рН 8.2). Последовательно использовали ступенчатый и линейный градиенты: 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 – плазида, 2 – РНК, 3 – белки.

Однако различия в сорбционном поведении ПТФЭ- и ПАНИ-содержащих сорбентов проявляются уже при попытке десорбировать удерживаемую сорбентами белковую фракцию. С ПТФЭ-колонок суммарную белковую фракцию можно

полностью десорбировать только в режиме обращено-фазовой ВЭЖХ в условиях возрастающего градиента концентрации органического растворителя аналогично тому, как это происходит при использовании С18-фаз. В этом режиме белки (и пептиды) элюируются тем быстрее, чем ниже их гидрофобность (Рисунок 3.2).

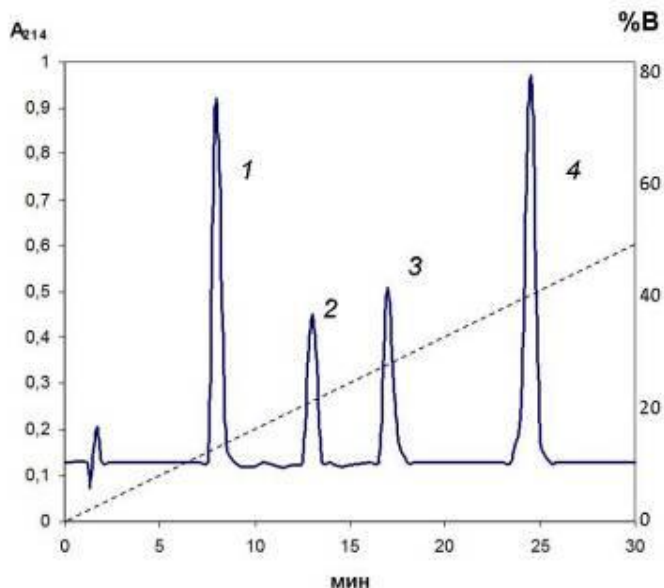


Рисунок 3.2 - Разделение компонентов белковой смеси, содержащей β -эндорфин (1), цитохром С (2), лизоцим (3) и яичный альбумин (4) на колонке, упакованной носителем TrisopogTM-500, модифицированным ПТФЭ (250 x 4.6 мм D_{вн.}). Скорость элюции: 1.0 мл/мин. Буферный раствор А: 0.1% ТФУ, буферный раствор Б: 90% ацетонитрил в буферном растворе А. Градиент: 10 – 50% буферного раствора Б в течение 30 мин.

Напротив, рН-чувствительность ПАНИ-покрытия, проявляющаяся за счет присутствия атомов азота и наличия системы полисопряжения в структуре макромолекулы ПАНИ, по-видимому, определяет иной механизм удерживания белков (пептидов). В результате белки выходят с колонки в условиях понижающегося градиента рН в зависимости от значения их изоэлектрической точки (рI), но не молекулярной массы или гидрофобности (Рисунок 3.3). Следует отметить, что практическое использование этого эффекта в хроматографии может обеспечить ощутимое преимущество при разделении компонентов белковых смесей по сравнению с фторполимерсодержащими сорбентами, поскольку при использовании ПАНИ-сорбентов не требуется добавлять органические компоненты в подвижную фазу.

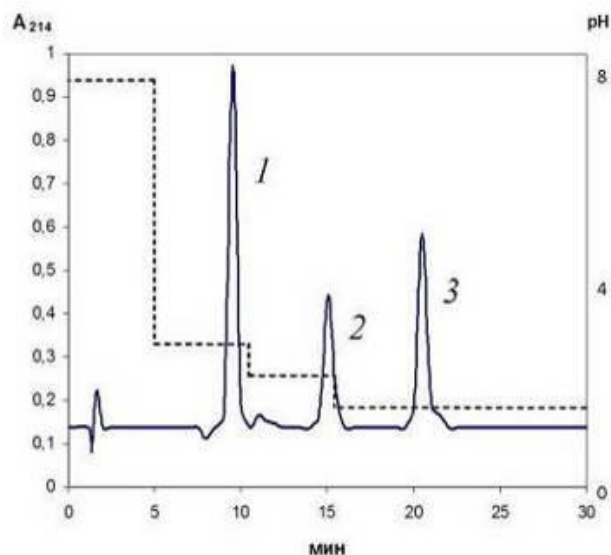


Рисунок 3.3 - Разделение смеси белков на стеклянной колонке (150 x 5 мм D_{вн.}), упакованной МПС-1150-ПАНИ, в ступенчатом градиенте рН (7.5 – 1.6): скорость элюции: 250 мкл/мин; раствор А – деионизованная вода; раствор Б – 0.015 М водная соляная кислота; градиент: 0 – 55% раствора Б в течение 30 мин. 1 – лизоцим (pI = 11.3); 2 – цитохром С (pI = 10.6); 3 – миоглобин (pI = 7).

Таким образом, если на этапе разделения фракций НК и белков композиционные сорбенты с перфторполимерными и ПАНИ-покрытиями демонстрируют сходные сорбционные свойства, то удерживание и последующая десорбция компонентов белковой фракции, вероятно, происходят по различным механизмам, определяемым химической структурой полимерных модификаторов.

3.2. Морфология, химический состав и заряд поверхностного слоя исследуемых полимерных покрытий

На сорбционные свойства сорбента могут влиять как химическая структура макромолекул поверхностного слоя, так и особенности его поверхностной морфологии. В зависимости от природы функциональных групп, присутствующих на поверхности сорбента, их полярности и донорно-акцепторных свойств, эффективность сорбции НК и белков будет определяться реальной химической природой поверхностного слоя сорбента (которая может не совпадать с химической структурой, соответствующей брутто-формуле полимерного модификатора). Указанные свойства поверхности сорбента, а также природа молекул сорбата одновременно могут обуславливать реализацию различных механизмов сорбции. От морфологии поверхностного слоя сорбента может зависеть не только сорбционная

емкость, но и степень влияния материала подложки на сорбционные свойства (в случае сквозных пор в полимерном покрытии или при отсутствии сплошного покрытия), а также наличие молекулярно-ситового эффекта. Таким образом, необходимо по отдельности оценивать как влияние химической структуры поверхностного слоя, так и особенности его морфологии.

3.2.1. Объекты исследования

Традиционная колоночная хроматография является относительно медленным процессом, для реализации которого требуется применение высоких давлений и специального оборудования. Значительная площадь поверхности (а следовательно, и сорбционная емкость) разработанных фторполимер- и ПАНИ-модифицированных сорбентов позволяет использовать их в составе компактных спин-колонок (картриджей). Такая методология предусматривает низкий расход сорбента (60 – 150 мг на картридж) и, как правило, обеспечивает биосепарацию в течение всего 3 - 5 мин. Обсуждаемые в данной главе результаты, полученные при исследовании статической сорбции биополимеров, получены с использованием именно таких спин-колонок, содержащих синтезированные сорбенты (характеристики которых обсуждаются в Главе 4). При работе с такими картриджами не требуется сложное дорогостоящее оборудование (такое как, например, ВЭЖХ-система). Оператору достаточно иметь в своем распоряжении компактную настольную центрифугу.

С целью получения экспериментальных данных, позволяющих судить о вероятных механизмах сорбции биополимеров на полученных материалах, а также для ответа на вопрос: присущи ли сорбционные свойства перфторполимеров полианилинам и другим классам полимеров, были исследованы свойства ряда специально полученных модельных сорбентов (модифицированных предварительно подобранными полимерами). Необходимые для исследования статической сорбции материалы получали методом кастинга на частицах объемно-пористого кремнезема (Глава 4). Для исследования динамической сорбции биополимеров в режиме реального времени полимерные покрытия наносили методом spin-coating на плоские стеклянные подложки, используя серию полиарамидов, содержащих набор таких «ключевых» элементов как ароматический азот, фтор, а также донорные и акцепторные фрагменты. Свойства полученных полимерных покрытий сравнивали со свойствами ФП- и ПАНИ-содержащих сорбентов, полученных по методикам, приведенным в Главе 2 диссертации. 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 полиарамидов, любезно предоставленных для исследования коллегами из Тайваньского университета (см. Глава 2), а также структуры фторполимера (фторопласта 42 Л) и ПАНИ приведены на Рисунке 3.4.

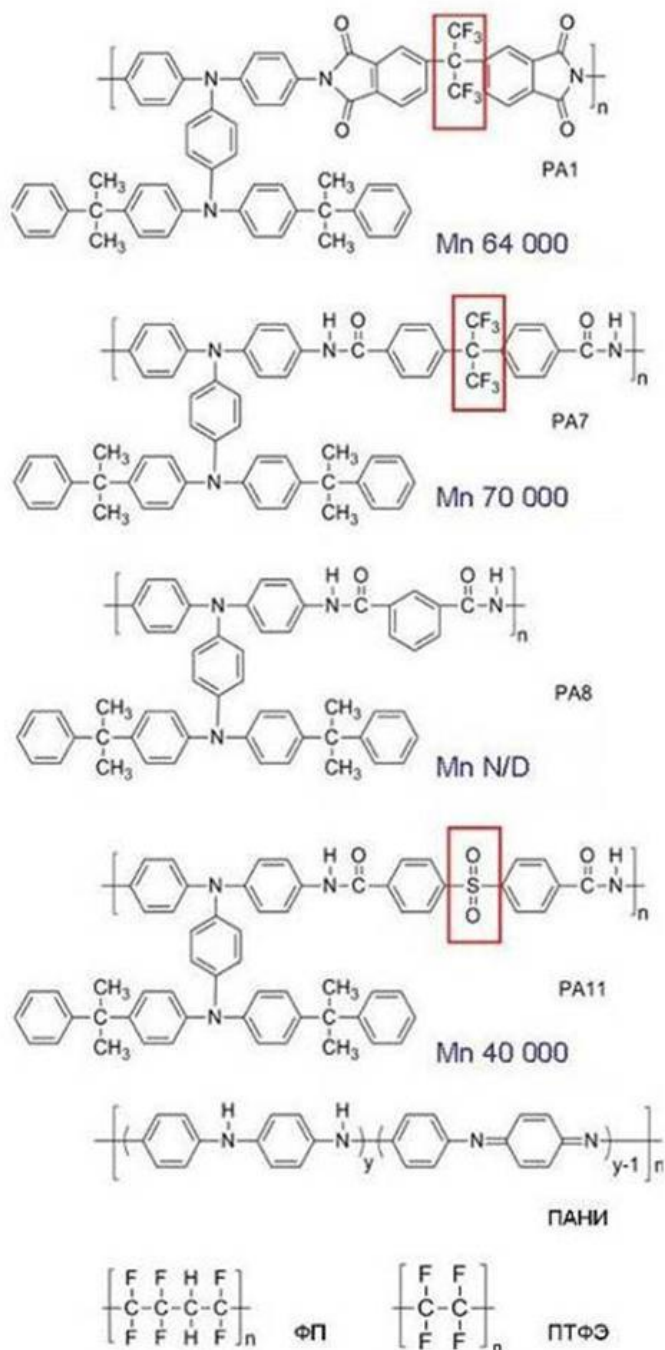
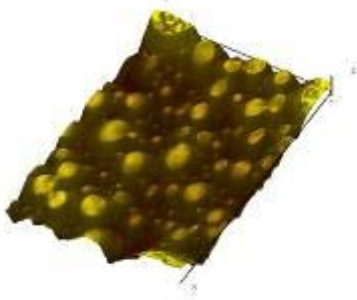
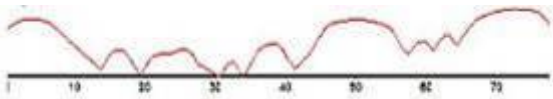


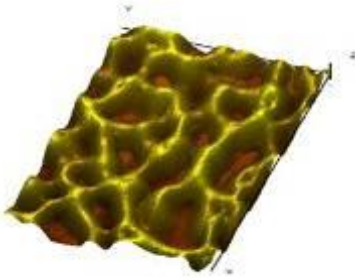

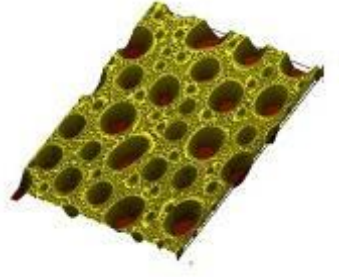




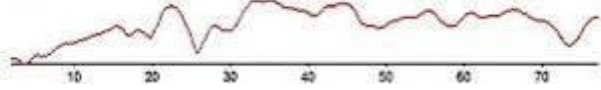
Рисунок 3.4 - Полимерные модификаторы, использованные для исследования морфологии поверхности покрытий и сорбции биополимеров.



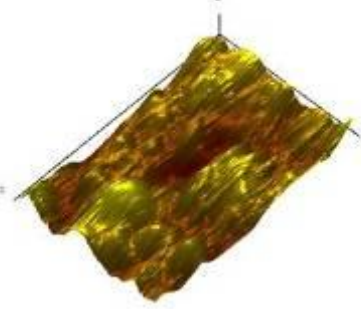

3.2.2. Особенности морфологии поверхности полученных полимерных покрытий

Морфологию полученных на поверхности стеклянных пластин полимерных покрытий исследовали методом сканирующей зондовой микроскопии. Полученные 3D-изображения и соответствующие рельефы поверхностей демонстрируют (Таблица 3.1), что полимерные покрытия неравномерны по толщине, а некоторые характеризуются наличием пористости. Так, при анализе рельефа образца РА8 явно определяются сквозные поры в толще покрытия, а на соответствующих изображениях определяется объемно-пористая структура. Покрытия РА1 и РА7 также заметно изменяются по толщине и имеют пористую структуру, хотя поры в этом случае несквозные. По сравнению с полиарамидными покрытиями ФП- и ПАНИ-покрытия имеют относительно ровную поверхность без сквозных пор. В случае ФП-ПАНИ-образца на поверхности предварительно полученного слоя фторопласта формируется значительно более гладкое ПАНИ-покрытие, чем при полимеризации анилина в отсутствие фторполимера. В целом, поверхность полимерных покрытий, получаемых химическими методами, оказывается значительно более гладкой по сравнению с покрытиями, полученными нанесением из готовых растворов полимеров (т. е. методом кастинга).

Таблица 3.1 - Результаты зондовой микроскопии. 3D-изображения поверхностей и характеристики соответствующих рельефов.

Образец	3D - изображение	Профиль
РА1	 <p data-bbox="528 1756 759 1783">85.22 um x 56.95 um</p>	 <p data-bbox="1054 1653 1337 1680">Max height = 1321.39 nm</p>

PA7	 <p>86.59 μm x 56.17 μm</p>	 <p>Max height = 316.75 nm</p>
PA8	 <p>86.59 μm x 56.06 μm</p>	 <p>Max height = 341.17 nm</p>
PA11	 <p>86.59 μm x 56.06 μm</p>	 <p>Max height = 55.23 nm</p>
$\Phi\Pi$	 <p>85.91 μm x 56.17 μm</p>	 <p>Max height = 405.26 nm</p>

ПАНИ	 <p>85.86 um x 65.69 um</p>	 <p>Max height = 319.35 nm</p>
ФП-ПАНИ	 <p>81.88 um x 53.12 um</p>	 <p>Max height = 1016.66 nm</p>

Таким образом, все исследованные полимеры образуют более или менее равномерно распределенные покрытия на поверхности стеклянной пластины, хотя морфология поверхности и эффективная толщина полученных полимерных покрытий существенно различаются. Влияние морфологии покрытий на сорбционные свойства исследуемых полимеров будет обсуждаться ниже. Результаты, полученные методом зондовой микроскопии, сопоставляли с данными рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС), которые обсуждаются в следующем подразделе диссертации.

3.2.3. Химический состав и заряд поверхностного слоя исследуемых полимерных покрытий

В рамках проводимого исследования было необходимо подтвердить соответствие реальной химической структуры поверхностных слоев полученных нанопокровтий их ожидаемому химическому составу (исходя из брутто-формул использованных полимерных модификаторов). С этой целью покрытия исследовали методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС). Предполагалось, что применение этого метода может оказаться полезным при выявлении возможных различий в химическом составе на поверхности и в толще полученных полимерных нанопокровтий.

При получении необходимых для исследования образцов методом кастинга наносили равномерно распределенный слой полимера из соответствующего раствора на поверхность ситалловой подложки с золотым покрытием. Спектры РФЭС получали в сверхвысоком вакууме, облучая исследуемый материал пучком рентгеновских лучей, и регистрируя зависимость количества испускаемых в результате этого воздействия электронов от их кинетической энергии. Необходимо заметить, что регистрируемые электроны испускаются верхним слоем исследуемого материала толщиной не более 1 - 10 нм.

Подложку с золотым покрытием использовали по ряду причин. Во-первых, потому, что в атмосферном воздухе содержится известное количество углеводородов, способных адсорбироваться на твердой поверхности и загрязнять ее, образуя слои толщиной порядка 1 нм. Металлические, кремниевые поверхности, а также полимерные покрытия удерживают такие углеродсодержащие примеси, что приводит к искажению результатов при регистрации спектров полимеров, поскольку часть сигнала будет относиться к углеводородному загрязнению. Во-вторых, поверхности упомянутых выше материалов могут окисляться и затем взаимодействовать с нанесенным полимерным покрытием. В результате может возникнуть ситуация, когда значения характеристической энергии связи, относящейся к конкретному металлу или к смеси оксидов, будут заранее не известными. В-третьих, поскольку стекло или оксид алюминия являются диэлектриками, их поверхность заряжается в процессе анализа, что приводит к уширению пиков и потере аналитической информации за счет низкого разрешения. Напротив, золото, будучи благородным металлом, в указанных условиях устойчиво к окислению кислородом воздуха, поэтому подложка с золотым покрытием в наибольшей степени подходит для анализа углеродсодержащих материалов (полимеров).

Макромолекулы исследуемых полимеров (кроме фторопласта) представляют собой полисопряженные системы, обладающие электронной проводимостью вдоль сопряженных π -связей, что не накладывает дополнительных ограничений для проведения анализа, однако во избежание дополнительной зарядки в процессе измерения толщина нанесенного полимерного покрытия не превышала 10 нм, что позволяло градуировать шкалу энергий связи по линии золота Au 4f из подложки.

Дополнительную пробоподготовку образцов не проводили, поскольку полимерные материалы чувствительны к воздействию излучения (как исходного мягкого рентгеновского с энергией 1253 - 1486 эВ, так и вторичного фотоэлектронного), под действием которого в них происходит разрыв и перестройка

связей. Поэтому поверхность не подвергали ионному облучению и не нагревали для удаления адсорбированных примесей.

Структурные формулы исследуемых образцов были известны (Рисунок 3.4), что позволило рассчитать относительное содержание атомов, находящихся в определенных фрагментах молекул, и предположить теоретическую форму спектра. Предположительно, в полимерном покрытии в процессе нанесения и анализа могут возникать перестройки связей, а также проявляться эффекты дальнего взаимодействия. Поэтому теоретические спектры строили по известным структурным формулам, а для значений энергии связи компонентов были заданы интервалы. Пики кислорода и азота задавали с определенным соотношением интенсивностей, без конкретного значения энергии связи. Фтору соответствовал единственный пик, поскольку это самый электроотрицательный элемент, и химическое окружение в структурах, содержащих фтор, незначительно влияет на энергию связи. Энергия связи фтора зависит от степени замещения им водорода, но в исследуемых полиарамидах фтор присутствовал в единственной группе – CF_3 , поэтому соответствующую линию F 1s можно было использовать для градуировки энергий связи.

Здесь важно отметить, что для экспериментального определения атомных долей элементов использовали два подхода. Первый подход, применяемый для анализа тонких покрытий (пленок) с незначительным затуханием при выходе электронов из глубины покрытия, основан на вычислении относительной атомной концентрации как частного от деления исходной интенсивности пика на сечение фотоионизации. Или, другими словами, на определении отношения вероятности ионизации атома в единицу времени к плотности падающего потока. Этот способ вычислений обозначают *CS* (от английского «cross-section»). Вторым подходом применим для описания покрытий с толщиной, превышающей несколько средних длин свободного пробега для большинства линий элементов. В этом случае интенсивность выбранной линии элемента после деконволюции спектра делится на сечение фотоионизации и среднюю длину свободного пробега (СДСП) электрона с характеристической или средней кинетической энергией в анализируемом веществе. Этот способ вычислений обозначают как *IMFP* (от английского «inelastic mean free path»).

Таким образом, используя оба подхода для выбранной линии каждого элемента можно проверить, совпадает ли теоретически заданное окружение (связи первого и иногда второго порядка) с экспериментально определяемым окружением. В случае их несоответствия можно определить, какие именно группы имеют аномальные

химические сдвиги, что может быть связано с перестройкой структуры полимера. Затем вычисляется атомная доля элемента из полученных первым или вторым способом суммарных интенсивностей каждой линии. Экспериментально определенные атомные проценты сравнивают с теоретически вычисленными величинами. По полученным результатам судят о наличии углеводородного загрязнения (при завышенном количестве углерода), об окислении полимера (при завышенном содержании кислорода), о связывании с подложкой или об экспонировании отдельных групп на поверхности (при занижении или завышении соответствующих атомных долей). Кроме того, можно сделать косвенный вывод о толщине покрытия: если интенсивность линии, соответствующей подложке, достаточно высока, то покрытие либо тонкое, либо не сплошное. При исследовании тонких покрытий высока интенсивность линий атомов, входящих в состав подложки, и атомные концентрации покрытия близки к вычисленным первым способом (без учета СДСП электронов), а в случае толстых покрытий - вторым способом. На применимость второго способа накладывается ограничение, связанное с точностью теоретического вычисления кинетической энергии, поскольку при этом относительная погрешность может достигать 20%.

В результате расшифровки полученных РФЭС-спектров были получены данные (для наглядности представленные в виде диаграмм на Рисунке 3.5) об относительном содержании различных атомов в исследуемых образцах полимерных покрытий. Анализируя эти данные, можно сделать следующие выводы. Во-первых, для всех образцов теоретически рассчитанные и экспериментально определенные обоими методами атомные доли углерода примерно совпадают, различаясь в пределах ошибки метода. Аналогичное заключение можно сделать о содержании азота, серы и фтора. Однако следует отметить, что в образцах РА7 и РА8 экспериментально полученные значения содержания азота примерно на 30% ниже теоретических, по-видимому, за счет образования неравномерного по толщине пористого покрытия, что подтвердили данные зондовой микроскопии (Таблица 3.1). Так, в случае образца РА7 на 3D-изображении ясно видны сквозные поры в толще покрытия, а в случае образцов РА1 и РА8 покрытия заметно изменяются по толщине и также имеет пористую структуру, хотя поры в этом случае не сквозные, что подтверждается соответствующими профилями. Во-вторых, отдельно следует остановиться на данных по содержанию кислорода в образцах РА1 и РА8, которые превышают теоретически рассчитанную величину почти вдвое. По-видимому, это связано с удерживанием в

объеме пор покрытия молекул растворителя (ТГФ) в процессе получения образцов для исследования.

Тем не менее, несмотря на существенные различия в морфологии поверхности полученных образцов, анализ данных об их химическом составе позволяет сделать заключение о том, что реальные химические структуры поверхностных слоев в исследованных образцах соответствуют брутто-формулам использованных полимерных модификаторов. Таким образом, полученные полимерные покрытия оказываются пригодными для проведения сравнительного исследования сорбционных свойств в зависимости от химической структуры полимерного модификатора.

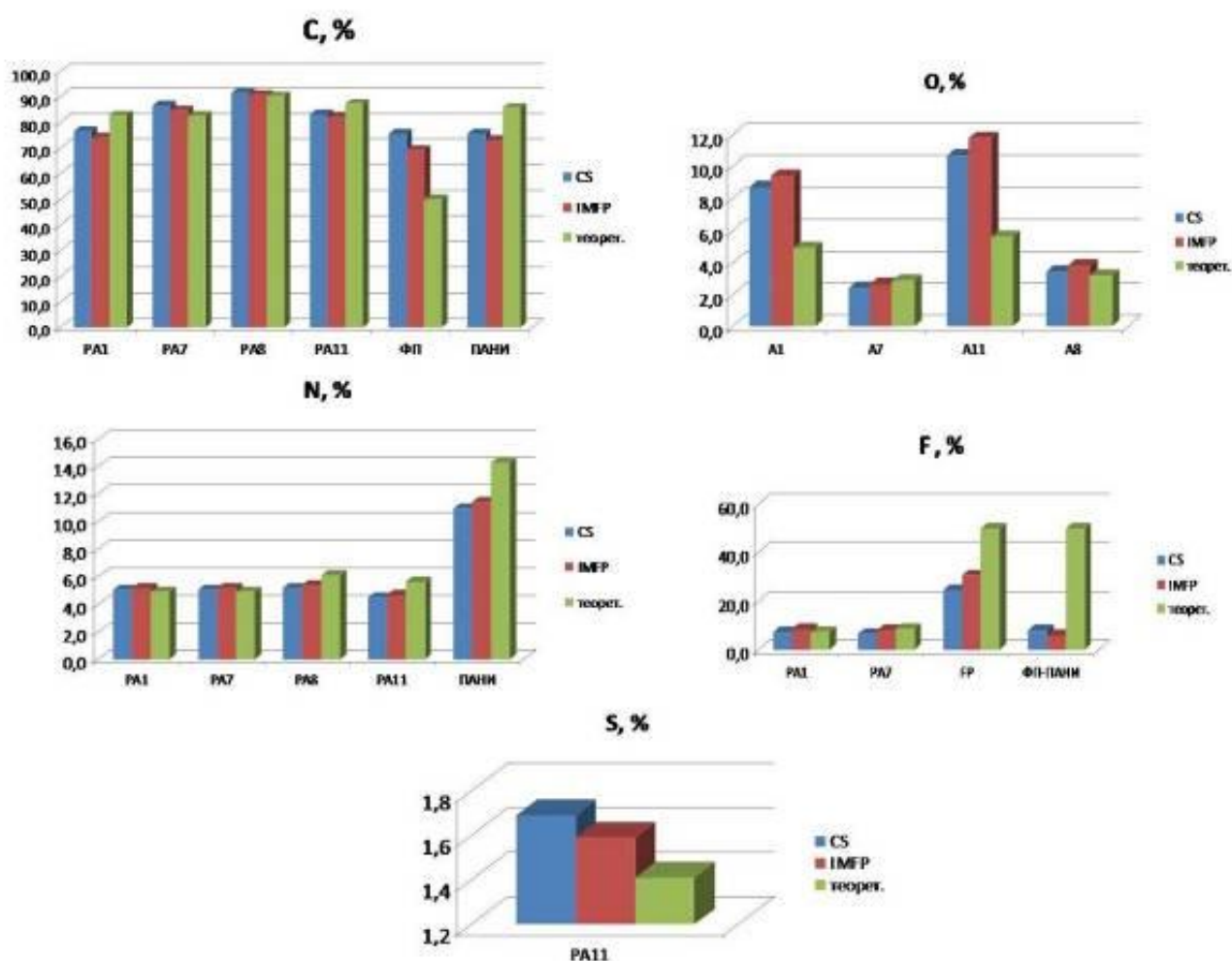


Рисунок 3.5 - Относительное содержание различных атомов в исследуемых образцах полимерных покрытий, вычисленное методами CS, IMFP и рассчитанное исходя из структурных формул соответствующих полимеров.

Дополнительная информация о свойствах полученных покрытий была получена 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 данных, обсуждаемых в данной главе, все они (включая данные по сорбции биополимеров) сведены в Таблице 3.3.

3.3. Сорбционные свойства полимерных покрытий в отношении нуклеиновых кислот и белков

Сорбция растворенного вещества на твердой поверхности может происходить как в статических, так и в динамических условиях. Применительно к условиям проведенного исследования сорбцию следует считать статической, если вещество, находящееся в неподвижной жидкой фазе, удерживается в результате контакта с неподвижным слоем частиц сорбента. В этом случае *статическая сорбционная активность* сорбента характеризуется количеством удерживаемого вещества на единицу массы сорбента к моменту достижения равновесия при неизменных температуре жидкости и начальной концентрации растворенного вещества. Динамическая сорбция происходит в том случае, когда удерживаемое вещество находится в подвижной жидкой фазе, пропускаемой над исследуемой полимерной поверхностью. Тогда *динамическую сорбционную активность* покрытия в первом приближении проще всего охарактеризовать временем от начала пропускания раствора сорбата до насыщения формируемого адсорбционного слоя. Очевидно, что скорость формирования и толщина образуемого адсорбционного слоя будут зависеть не только от свойств поверхности, но и от природы сорбата.

В данной части исследования решились следующие задачи. Во-первых, было важно обобщить и сравнить данные исследования сорбционных свойств полученных сорбентов в режиме *статической сорбции* (протекающей в результате контакта компонентов смеси после пропитки неподвижного слоя сорбента аликвотой образца, содержащего биополимер или их смесь) и в режиме *динамической сорбции* (при пропускании образца над поверхностью пластины, предварительно покрытой слоем исследуемого полимера). В первом случае данные получали методами спектрофотометрического и электрофоретического анализа. Во втором случае

формирование адсорбционного слоя на пластине регистрировали в режиме реального времени методом спектрально-корреляционной интерферометрии (СКИ) [336, 337].

Во-вторых, данные, получаемые при исследовании сорбции биополимеров в различных режимах, могут не совпадать. В этом случае необходимо проанализировать причины таких различий, сопоставляя результаты исследования сорбции с данными о составе и морфологии исследованных покрытий.

В-третьих, предполагалось, что анализ полученных данных позволит сделать заключение о вероятных механизмах сорбции НК и белков на поверхности разработанных полимерсодержащих сорбентов.

3.3.1. Удерживание биополимеров полученными сорбентами в режиме статической сорбции

Данные для исследования статической сорбции биополимеров на изучаемых полимерсодержащих кремнеземах получали, нанося на картридж, содержащий слой модельного сорбента (150 мг), аликвоту модельного раствора биополимера или бактериального лизата таким образом, чтобы аликвота полностью смочила 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 Таблице 3.2.

Необходимо отметить, что с целью оценки влияния, которое оказывает предварительное смачивание (уравновешивание) слоя сорбента водой или слабо-солевым буферным раствором на выход НК, элюаты получали, нанося аликвоты растворов биополимеров непосредственно на картридж либо после их предварительного смачивания.

Определенные в настоящем исследовании характеристики изученных полимерных покрытий и сорбционные свойства разработанных сорбентов для удобства сведены в Таблице 3.3. В частности, для всех исследованных сорбентов приведены спектрофотометрические данные о выходе ДНК и РНК, а также сорбционная емкость по белкам, различающихся молекулярной массой и значениями рI.

Таблица 3.2 - Некоторые характеристики использованных в исследовании биополимеров.

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

* См. раздел 3.3.2.

** Среднюю молекулярную массу нуклеотида принимали равной 345.

Из данных Таблицы 3.3 следует, что эффект «негативной селекции» в отношении двунитевой ДНК (днДНК) отмечен для всех материалов, хотя между ними наблюдаются определенные различия. Так, в группе полиарамидсодержащих сорбентов содержание днДНК в элюатах (выход ДНК) различается между отдельными образцами, однако различие не превышает 15%. В этой группе максимальный выход днДНК (75% от количества в исходном растворе) наблюдали при использовании сорбентов, полимерные покрытия которых одновременно содержали трифторметильные и электроноакцепторные группы. Высокий выход днДНК (80%) наблюдали для ФП-ПАНИ-сорбента. Увеличить выход днДНК до 99.9% в этом случае удастся, предварительно смочив слой сорбента водой или нейтральным буферным раствором прежде нанесения раствора, содержащего НК. 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 полиарамидов, но ниже, чем при использовании ПАНИ-содержащих сорбентов, что в последнем случае, безусловно, подтверждает наличие эффекта «негативной селекции» в отношении днДНК.

Таблица 3.3 – Характеристики исследованных полимерных покрытий и сорбционные свойства исследованных сорбентов (численные данные представлены как $\pm SD$, $n = 3$).

Полимерный модификатор	РА1	РА7	РА8	РА11	ПТФЭ	ФП	ПАНИ	ФП-ПАНИ
Характеристики полимерного покрытия								
ξ -потенциал, mV	2.1 \pm 0.63	2.3 \pm 0.51	1.6 \pm 0.39	5.3 \pm 0.94	н/о	10.2 \pm 0.63	32.0 \pm 5.15	30.4 \pm 0.96
максимальная толщина покрытия, нм	1321.39	316.75	341.17	55.23	н/о	405.26	319.35	1016.66
наличие сквозных пор в покрытии**	+/-	+/-	+	-	н/о	-	-	-
<i>** + - сквозные поры, +/- - несквозные поры.</i>								
Удерживание биополимеров*								
выход ДНК, %	74 \pm 0.56	75 \pm 0.57	60 \pm 0.52	63 \pm 0.51	67 \pm 0.52	65 \pm 0.42	71 \pm 0.59	80 \pm 0.84
выход РНК, %	30 \pm 0.33	30 \pm 0.32	7 \pm 0.18	15 \pm 0.24	2 \pm 0.08	7.0 \pm 0.18	4 \pm 0.12	5 \pm 0.15
Емкость по белку, мг/г сорбента*								
БСА	8.0 \pm 0.21	8.0 \pm 0.19	7.0 \pm 0.16	7.0 \pm 0.18	8.0 \pm 0.20	7.0 \pm 0.17	7.0 \pm 0.17	7.0 \pm 0.16
пепсин	7.0 \pm 0.18	6.5 \pm 0.15	7.0 \pm 0.17	7.0 \pm 0.18	7.5 \pm 0.19	7.0 \pm 0.17	6.0 \pm 0.12	6.0 \pm 0.13
цитохром С	8.0 \pm 0.21	8.5 \pm 0.18	7.5 \pm 0.21	7.5 \pm 0.19	8.0 \pm 0.19	8.0 \pm 0.20	9.0 \pm 0.25	9.0 \pm 0.21
лизоцим	8.0 \pm 0.20	8.4 \pm 0.15	7.3 \pm 0.25	7.5 \pm 0.18	8.0 \pm 0.20	8.0 \pm 0.18	8.5 \pm 0.25	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
<i>*растворы (смеси) биополимеров наносили на предварительно смоченные картриджи</i>								
<i>** A₂₆₀/A₂₈₀ для смеси (ДНК + БСА) составляет 0.9.</i>								
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
лизоцим	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
δ нДНК	-	-	-	-	н/о	н/о	-	н/о
Толщина адсорбционного слоя, нм								
БСА	1.0 \pm 0.1	1.5 \pm 0.15	1.4 \pm 0.15	2.1 \pm 0.2	н/о	н/о	1.7 \pm 0.2	н/о
лизоцим	0.2 \pm 0.015	0.2 \pm 0.015	1.3 \pm 0.15	2.5 \pm 0.2	н/о	н/о	2.1 \pm 0.2	н/о
пепсин	-	-	-	-	н/о	н/о	-	н/о
δ нДНК	-	-	-	-	н/о	н/о	-	н/о

РНК, имеющая в своей структуре как двунитевые, так и одонитевые последовательности, удерживается всеми исследованными сорбентами значительно

сильнее, чем δ нДНК. До 70% РНК удерживают материалы PA1 и PA7. Сорбенты, модифицированные полиарамидами PA11 и PA8, удерживают 85 и 93% РНК, соответственно. На сорбентах, модифицированных ПАНИ и ФП-ПАНИ, удерживается более 95% РНК. ПТФЭ-содержащий материал удерживает РНК практически полностью (98%).

Необходимо отметить, что 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 (Рисунок 3.6) элюатов, полученных после пропускания через картриджи с сорбентами раствора δ нДНК-фрагментов различной длины (от 75 до 2000 п.о.), а также после пропускания бактериального лизата *E. coli*, соответствуют данным Таблицы 3.3.

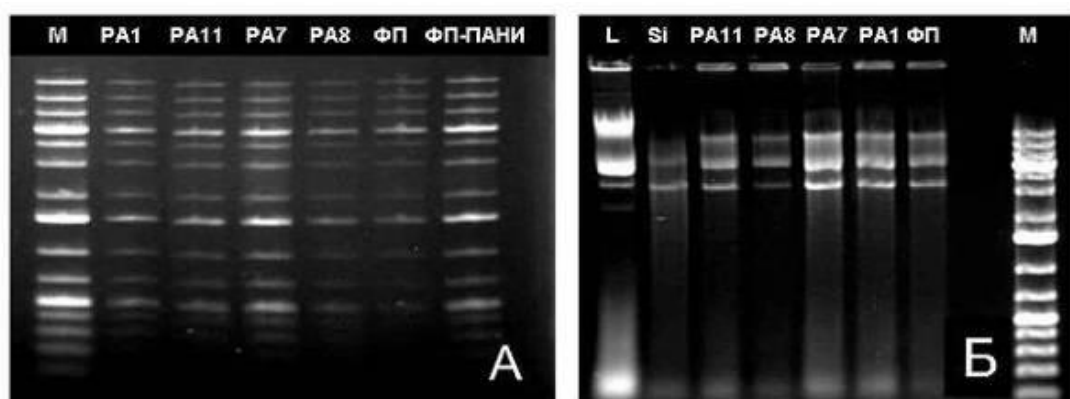


Рисунок 3.6 - Электрофорез в 0.8% агарозном геле (А) ДНК-фрагментов (1 kb DNA Ladder GeneRuler™ 75 - 20000 bp), содержащихся в полученных элюатах (М - исходный раствор ДНК-фрагментов, 1 мкл в 20 мкл образца, аббревиатуры над треками обозначают полимерный модификатор соответствующего модельного сорбента) 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) [338].

Анализ представленной на Рисунке 3.6 электрофореграммы позволяет 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 (т. е. от длины макромолекулы, а следовательно, от числа точечных контактов с поверхностью сорбента), что является доказательством отсутствия значимого сорбционного взаимодействия ДНК-молекул с исследуемыми полимерными поверхностями. В противном случае на большинстве треков мы не увидели бы полос, соответствующих высокомолекулярным ДНК-фрагментам. Этот

вывод справедлив, по крайней мере, для *днДНК* (когда сорбционная активность исследованных сорбентов низка). Некоторые потери *днДНК* можно объяснить молекулярно-ситовым эффектом при использовании объемно-пористых сорбентов. Возможные причины наблюдаемых различий в удерживании *днДНК* исследуемыми покрытиями и собственно эффекта «*негативной селекции*» в отношении НК будут обсуждаться ниже.

Из диаграммы на Рисунке 3.7 следует, что полиарамидные покрытия, содержащие электроноакцепторные группы (РА1 и РА7), по селективности к паре ДНК - РНК (за счет одновременного удерживания значительной доли РНК и слабого удерживания *днДНК*) ближе по своим сорбционным свойствам 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, сорбенты РА8 и РА11 не обеспечивают достаточной очистки ДНК от РНК.

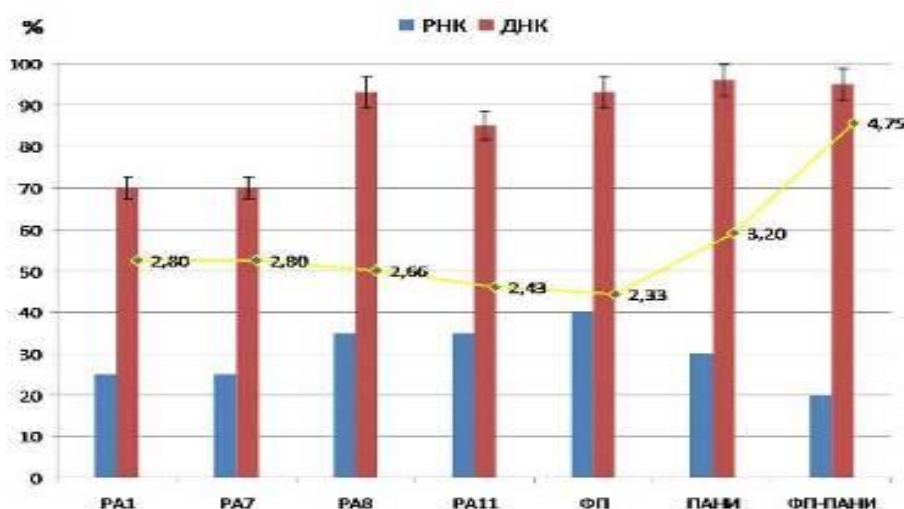


Рисунок 3.7 - Содержание *днДНК* и РНК в элюатах, полученных с использованием исследуемых сорбентов. За 100% принято содержание НК в растворе до нанесения на картридж. Для наглядности приведены отношения содержания ДНК и РНК в элюатах для каждого конкретного случая (желтая линия). Смесь НК наносили на сухие картриджи.

Из сравнения выходов ДНК и РНК в элюатах также видно (Таблица 3.3), что перфторполимер- и ПАНИ-модифицированные сорбенты обеспечивают более 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). В случае остальных образцов степень очистки ДНК от РНК значительно ниже, в том

числе, при использовании материалов, модифицированных полимерами с низким содержанием атомов фтора (РА1 и РА7).

Таким образом, эффект *«негативной селекции»* в отношении НК (хотя и в различной степени) демонстрируют как фторполимер- и ПАНИ-содержащие сорбенты, так и материалы, модифицированные полиамидами с *«промежуточной»* химической структурой.

Следует отметить, что содержание НК в элюатах, полученных при нанесении на предварительно смоченные и на сухие картриджи, различается, поскольку в последнем случае в порах сорбентов удерживается определенный объем наносимой пробы (определяемый объемом пор сорбента), что приводит к ожидаемому снижению выхода. Поэтому последующие тесты проводили с использованием предварительно смоченных картриджей. В дальнейшем смоченные картриджи использовали в протоколах пробоподготовки при демонстрации результатов практического применения разработанных сорбентов (Глава 5).

В ходе проводимого 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 pI) сильнее сказывается на связывании белков поверхностями исследуемых сорбентов. С этой целью на предварительно смоченные картриджи с сорбентами наносили аликвоты растворов индивидуальных белков, различающихся указанными характеристиками.

Из диаграммы на Рисунке 3.8 и из данных Таблицы 3.3 следует, что все исследованные сорбенты способны удерживать белки (65% - 85% от нанесенного количества). Оказалось, что, сорбционная емкость полиамидсодержащих сорбентов, модифицированных полимерами РА1, РА8 и РА11, мало зависит как от молекулярной массы, так и от pI белка, и составляет 6.8 – 8.2 мг белка/г сорбента. И только в случае РА7-модифицированного материала обнаруживается явная зависимость сорбционной емкости от природы белка (от значения его pI), 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).

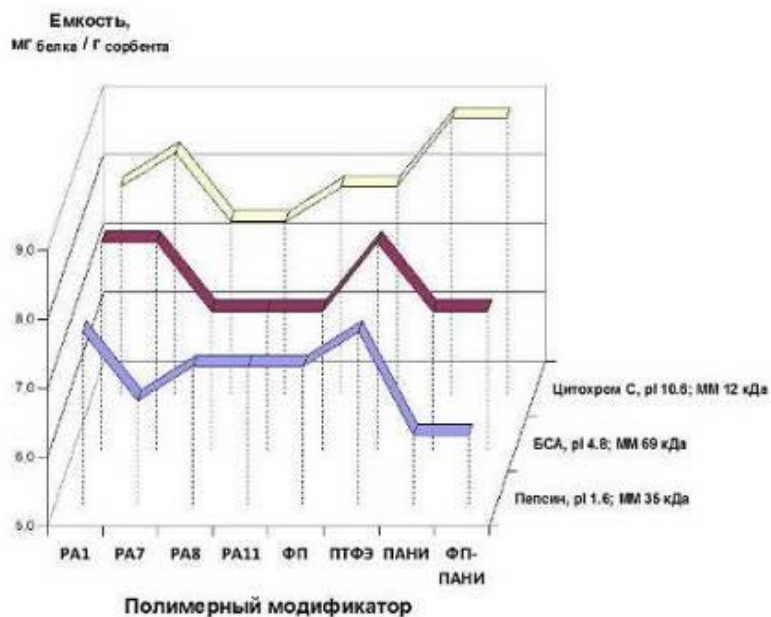


Рисунок 3.8 - Сорбционная емкость исследованных сорбентов на примере удерживания трех белков.

Таким образом, при использовании как РА7-, так и ПАНИ-содержащих материалов сорбционная емкость растет с увеличением основности (рI) белка. Для остальных исследованных материалов эта зависимость также наблюдается, хоть и не столь явно. Как будет показано ниже, выявленное свойство ПАНИ-содержащих сорбентов можно использовать не только для очистки препаратов НК от белков, но также для разделения компонентов белковой фракции.



Рисунок 3.9 - Сравнение степени очистки ДНК от БСА в результате использования исследуемых сорбентов. Цифрами указаны соотношения поглощения элюатов при 260 и 280 нм.

Различие в сорбстве исследуемых полимерных покрытий к НК и белкам наглядно продемонстрировано на Рисунке 3.9 на примере очистки ДНК от БСА при пропускании смеси этих биополимеров через картриджи с сорбентами. На представленной диаграмме указаны значения поглощения при 260 и 280 нм, определенные для исходных компонентов модельной смеси (растворов ДНК и белка), для их смеси до нанесения на картридж и для полученных элюатов.

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-содержащими материалами. Очевидно, что чем большее количество белка удерживается сорбентом, и чем слабее при этом сорбируется ДНК, тем выше оказывается степень очистки ДНК от белка, выражаемая отношением величин поглощения элюата при 260 и 280 нм (соответствующие значения указаны на диаграмме; наиболее чистому образцу ДНК соответствует величина 1.9). Образцам ДНК, в значительной степени 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 элюатов, выделенных из лизатов *E. coli* (1.5, 1.6 и 1.8, соответственно). Видно, что среди полиарамидсодержащих материалов сорбенты РА1 и РА7 обеспечивают выделение наиболее чистых образцов ДНК из модельных и реальных биологических смесей. Это означает, что наиболее близкие сорбционные свойства по отношению к биополимерам проявляют полиарамида с электроноакцепторными группами и ПАНИ-содержащие материалы.

Таким образом, показано, что введение в структуру полимерного модификатора фторсодержащих функциональных групп, незначительно, на первый взгляд, изменяющих суммарный химический состав (как в случае материалов РА7 и РА11), оказывает заметное влияние на сорбционные свойства получаемых полимерных покрытий.

Сопоставление полученных результатов по удерживанию НК, белков и степени очистки ДНК с использованием исследованных сорбентов позволяет прийти к заключению, что наиболее близкие сорбционные свойства демонстрируют полиарамида с электроноакцепторными группами (РА1 и РА7) и ПАНИ-содержащие материалы (т.е. сорбенты, модифицированные полисопряженным рН-чувствительным полимером).

Этот вывод подтверждается установленным нами фактом, что степень очистки препаратов ДНК, выделенной из бактериальных лизатов с применением ПАНИ-содержащих сорбентов, а также РА1- и РА7-сорбентов, обеспечивает возможность их непосредственного использования в ПЦР. В качестве примера на Рисунке 3.10 представлены результаты электрофореза ПЦР-фрагментов, полученных при выделении ДНК из лизата культуры *Agrobacterium tumefaciens* C58 с помощью РА7-сорбента. ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием видоспецифичных праймеров.

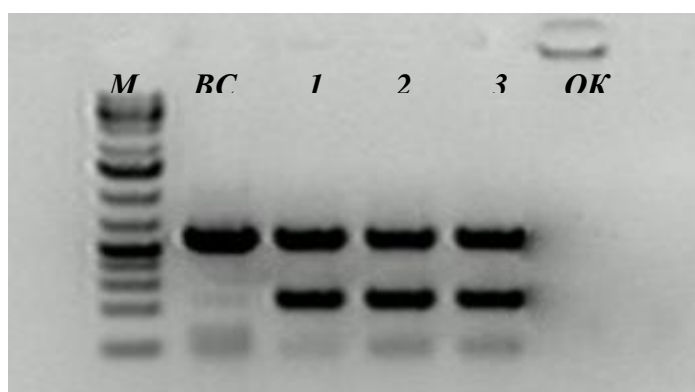


Рисунок 3.10 - Электрофореграмма ПЦР-фрагментов, полученных в результате ПЦР с элюатами, содержащими ДНК, выделенную из *Agrobacterium tumefaciens* C58 при использовании сорбента РА7 (1 - 3). М - ДНК-маркер (GeneRuler™ 20000—75 п.о., Fermentas, США); ВС – внутренний стандарт; ОК – отрицательный контроль (вода) [339].

Проведенные исследования позволили изучить роль различных факторов в сорбционном поведении полиарамид-, ФП- и ПАНИ-содержащих сорбентов при взаимодействии с НК и белками. В результате было установлено, что 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 использование полиарамидсодержащих материалов в качестве эффективных сорбентов для выделения НК нецелесообразно. По сравнению с ними ФП- и ПАНИ-сорбенты обеспечивают максимальный выход *днДНК* за счет наиболее ярко проявляющегося эффекта «*негативной селекции*», эффективнее удерживают РНК и белки, что делает эти композиты перспективными материалами для одностадийного выделения очищенных препаратов ДНК из биологических смесей.

При исследовании сорбции биополимеров в статических условиях было показано, что сорбционная емкость и селективность в процессах разделения фракций ДНК и РНК или НК и белков зависят как от химической структуры поверхностного слоя сорбента, так и от свойств биополимеров-сорбатов. Поэтому логично предположить, что результаты исследования сорбции биополимеров указанными полимерами в режиме реального времени дадут дополнительную ценную информацию о механизме этих процессов.

3.3.2. Удерживание биополимеров полученными сорбентами в режиме динамической сорбции

Для изучения механизмов сорбции биологически активных соединений (включая биополимеры) и процессов молекулярного узнавания с успехом применяют биосенсоры, биочипы и др. устройства, в основу которых положено использование поверхностного плазмонного резонанса [340], иммунохроматографии [341], некоторых вариантов иммунофлуоресцентного анализа [342], и др.

Сравнительно недавно разработан метод т. н. спектрально-корреляционной интерферометрии (СКИ) [336, 337]. В этом методе используется биосенсор на основе проточной микроячейки и детектора, состоящего из двух интерферометров, одним из которых служит тонкая стеклянная пластина с предварительно модифицированной тем или иным способом поверхностью (в зависимости от цели исследования). Над поверхностью пластины пропускают исследуемый раствор и в режиме реального времени измеряют интерференцию между опорным лучом, отраженным от нижней поверхности пластины, и лучом, отраженным от поверхности раздела «адсорбционный слой – вода», фиксируя изменение толщины адсорбированного слоя с разрешением по глубине в пикометровом диапазоне [337,343].

Мы предположили, что метод СКИ окажется эффективным при сравнительном исследовании в режиме реального времени сорбционных свойств поверхностей полимерных покрытий с различной химической структурой. Двухканальный биосенсор адаптировали для исследования сорбции днДНК и модельных белков, различающихся значениями молекулярной массы и pI , на поверхности стеклянных пластин, модифицированных ПАНИ и полиарамидами. Сорбцию биополимеров на поверхности покрытых полимерами стеклянных пластин в режиме реального времени исследовали на приборе Пикоскоп® (Россия), устройство которого подробно описано

в [336]. Принцип, положенный в основу метода СКИ, проиллюстрирован на Рисунке 3.11.

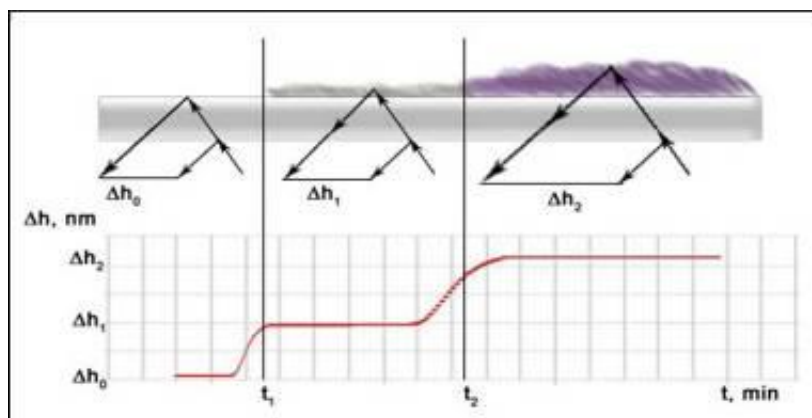


Рисунок 3.11 - Принцип формирования сигнала в методе СКИ [344].

Оптическая схема, использующая широкополосное излучение, состоит из двух интерферометров Фабри–Перо. Расстояние между зеркалами (база) одного из интерферометров периодически изменяется с помощью пьезоэлектрического преобразователя, а в качестве второго интерферометра, который одновременно является сенсорным чипом, используется плоскопараллельная стеклянная пластина (покровное стекло для микроскопа), вдоль поверхности которой пропускают исследуемые растворы биомолекул. Результат интерференции между опорным лучом, отраженным от нижней поверхности пластины, и лучом, отраженным от поверхности адсорбированного слоя зависит от фазовой толщины h суммарного слоя пластины и слоя удерживаемых молекул. Изменение этой толщины Δh в ходе реакции (или в процессе сорбции-десорбции) вычисляется по изменению фазы корреляционного сигнала с фотодиодов или ПЗС-камеры [343].

В качестве источника света использовали суперлюминесцентный диод с максимумом излучения при длине волны 850 нм и шириной спектра 30 нм. Стеклянные пластины (22 Ч 22 Ч 0.1 мм) толщиной ~ 0.1 мм покрывали нанослоями ПАНИ и полиарамидов. Вначале пластины очищали, выдерживая их в смеси серной кислоты с перекисью водорода в объемном соотношении 3:1 (раствор «пирания») 40 мин при 80 °С, затем отмывали водой до нейтрального значения рН смывов. ПАНИ-покрытия наносили в результате полимеризации анилина (0.02 М) непосредственно на поверхности пластины при комнатной температуре в присутствии 0.06 М хлористоводородной кислоты и 0.02 М персульфата аммония [345]. После того, как реакционная смесь начинала окрашиваться, пластины выдерживали еще 5 мин. Для прекращения реакции пластины обрабатывали 0.1 %-ным водным аммиаком, дважды

промывали водой и высушивали. Сплошные покрытия полиарамидов PA1, PA7, PA8 и PA11 толщиной не более 100 нм получали нанесением растворов указанных полимеров в ТГФ (0.4 % масс.) методом spin-coating. Для этого пластину фиксировали на роторе магнитной мешалки MSH-20A (DAIHAN Scientific, Корея), на пластину наносили раствор полимера (100 мкл) и центрифугировали 10 мин при 1.1 kg.

Следует отметить, что поверхность стеклянных пластин не покрывали слоями ПТФЭ, ФП и ФП-ПАНИ, что обусловлено несколькими причинами. В случае ПТФЭ для обработки поверхности требуется источник радиации, а также вакуумная и криотехника, что неоправданно усложнило бы процесс модификации. Поскольку поверхность плоской пластины не развита (в отличие от поверхности частиц объемно-пористого кремнезема), то при нанесении ФП-покрытия методом spin-coating из раствора ФП в ацетоне (температура кипения которого примерно на 10 °С ниже температуры кипения ТГФ) не удастся получить равномерно распределенное нанотолщинное ФП-покрытие. Последнее замечание справедливо также и для ФП-ПАНИ, поскольку в этом случае подложкой для полимеризации анилина должна служить поверхность носителя, предварительно покрытая нанотолщинным слоем фторопласта (ФП).

В качестве объектов для исследования сорбции использовали элюат δ ДНК из *E. coli* (50 мкг/мл), полученный в результате выделения ДНК с помощью спин-картриджа с ФП-ПАНИ-сорбентом, и белки, различающиеся значениями изоэлектрических точек и молекулярных масс (БСА, лизоцим и пепсин, по 1 мг/мл в натрий-фосфатном буфере, рН 7.2). Основные характеристики использованных биополимеров представлены в Таблице 3.2. В каждом отдельном эксперименте над поверхностью стеклянной пластины, модифицированной соответствующим полимером, пропускали растворы биополимеров или их смеси в натрий-фосфатном буфере, рН 7.2. Растворы, а также чистый натрий-фосфатный буфер и водный раствор хлористоводородной кислоты, рН 3.0, пропускали над пластиной со скоростью 15 мкл/мин. Растворы 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 тем же буферным раствором.

Фосфатные группы в молекуле ДНК полностью ионизированы при рН = 4.0. Таким образом, молекула ДНК заряжена отрицательно при рН ≥ 4.0 . В условиях проведения эксперимента (рН 7.2) заряд молекулы БСА наиболее близок к

нейтральному по сравнению с другими исследованными белками, суммарный заряд лизоцима положительный, пепсина - отрицательный.

На Рисунке 3.12 представлены результаты сорбции ДНК и белков на ПАНИ-поверхности. Видно, что в процессе пропускания раствора ДНК над плоской поверхностью ПАНИ-модифицированной пластины молекулы ДНК не образуют устойчивого адсорбционного слоя (желтая линия), что хорошо коррелирует с результатами исследований удерживания ДНК в режиме статической сорбции с помощью картриджей с объемно-пористыми сорбентами, модифицированными исследуемыми полимерами, в том числе ПАНИ [339, 344].

Поскольку ПАНИ является рН-чувствительным материалом, способность ПАНИ-содержащих сорбентов удерживать белки (сорбционная емкость) зависит от рН среды. Можно ожидать, что в нейтральных средах белки с более высокими значениями рI будут сильнее удерживаться на поверхности ПАНИ-покрытия, что и подтверждается экспериментально. В описываемых условиях макромолекулы пепсина (рI 2.2), несущие сильный отрицательный заряд в среде с рН 7.2 (Рисунок 3.12, синяя штрих-пунктирная линия), так же, как и молекулы днДНК (Рисунок 3.12, желтая пунктирная линия), не образовывали устойчивого адсорбционного слоя. В случае БСА и лизоцима наблюдалась иная картина. В обоих случаях на ПАНИ-поверхности формировался устойчивый адсорбционный слой, который сохранялся после прекращения подачи новых порций раствора белка и разрушался только в результате заметного понижения рН среды (до 3.0).

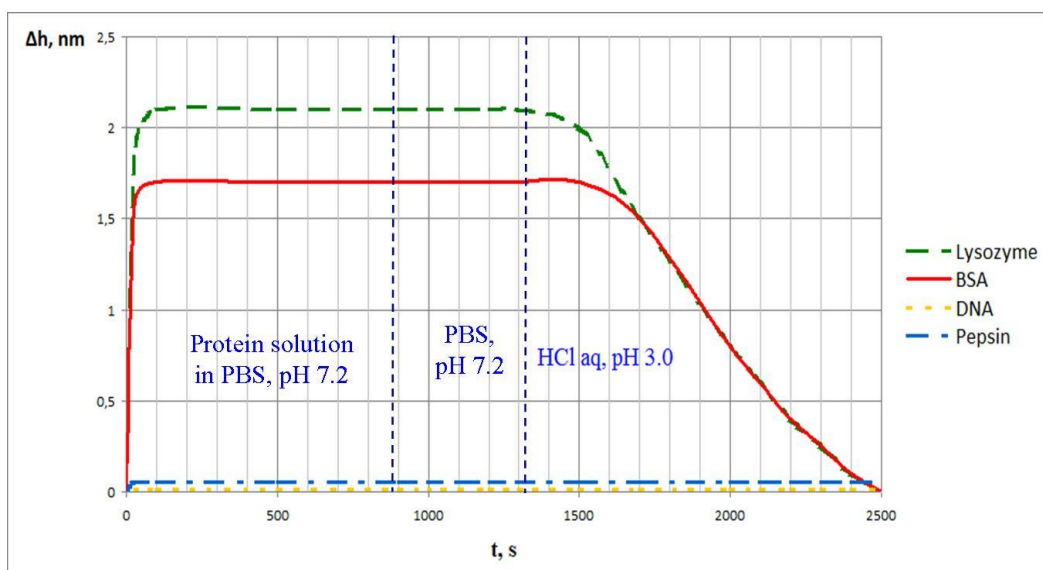


Рисунок 3.12 - Динамика сорбции биополимеров на поверхности стеклянных пластин, модифицированных ПАНИ (скорость потока 15 мкл/мин) [344].

При пропускании раствора БСА над поверхностями всех других исследованных полимерных покрытий также происходила адсорбция. Количество адсорбированного белка зависело от состава покрытия: было максимально в случае РА11- и ПАНИ-покрытий, но минимально в случае РА1-покрытия. На Рисунках 3.13 и 3.14 представлены сенсограммы, иллюстрирующие зависимость толщины (Δh) образующегося адсорбционного слоя от времени (t), для БСА и лизоцима, соответственно.

При использовании полиамидов при подаче в кювету растворов белков с $pI > 4$ обратимо формируется адсорбционный слой толщиной 0.2 - 2.5 нм, который разрушается при подаче подвижной фазы, не содержащей белки. На ПАНИ-покрытии белки прочно удерживаются при нейтральных рН среды и десорбируются только при существенном понижении рН. Таким образом, *динамическая сорбционная активность* ПАНИ-покрытия проявляется сильнее по сравнению с покрытиями из полиамидов. Время насыщения адсорбционного слоя (т. е. время с момента подачи раствора биополимера до выхода сенсограммы на плато) на полиамидных покрытиях превышало в 2.5 – 8.75 раз этот показатель по сравнению с ПАНИ-покрытием. При этом 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 всех исследованных белков, его молярная гидрофобность (определяемая суммой молярных гидрофобностей боковых групп аминокислотных остатков, входящих в состав данного белка) составляет 1130 кДж/моль, в то время как для пепсина эта величина равна 865 кДж/моль, а для лизоцима – 306 кДж/моль [345]. Наиболее гидрофобные покрытия на основе полимеров, содержащих трифторметильную группу (РА1 и РА7), 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 (Таблица 3.3). Таким образом, полиамиды с электрондонорными группами (РА1 и РА7) нецелесообразно использовать для сорбции основных белков. Полимер РА8 хорошо удерживает как слабо отрицательно заряженный БСА, так и положительно заряженный в данных условиях лизоцим (толщина слоя ~ 1.3 нм). Различие с ПАНИ-поверхностью в этом случае заключается в том, что в данных условиях на ПАНИ-покрытии, в отличие от РА8-покрытия, насыщенный адсорбционный слой образуется

в 2.5 раза быстрее при сорбции БСА и в 5 раз быстрее при сорбции лизоцима (по-видимому, из-за стерических затруднений при сорбции 4-х субъединичного БСА).

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. При формировании нескольких монослоев определяемая толщина слоя будет превышать эффективный размер глобулы. Максимальная сорбция БСА на различных поверхностях достигалась за 1.5 – 4 мин (1.7 нм в случае ПАНИ- и 1.5 нм - в случае РА7-материала). На РА8- и РА11-поверхностях насыщенный слой БСА (1.4 и 2.1 нм, соответственно) формировался примерно за 2 мин.

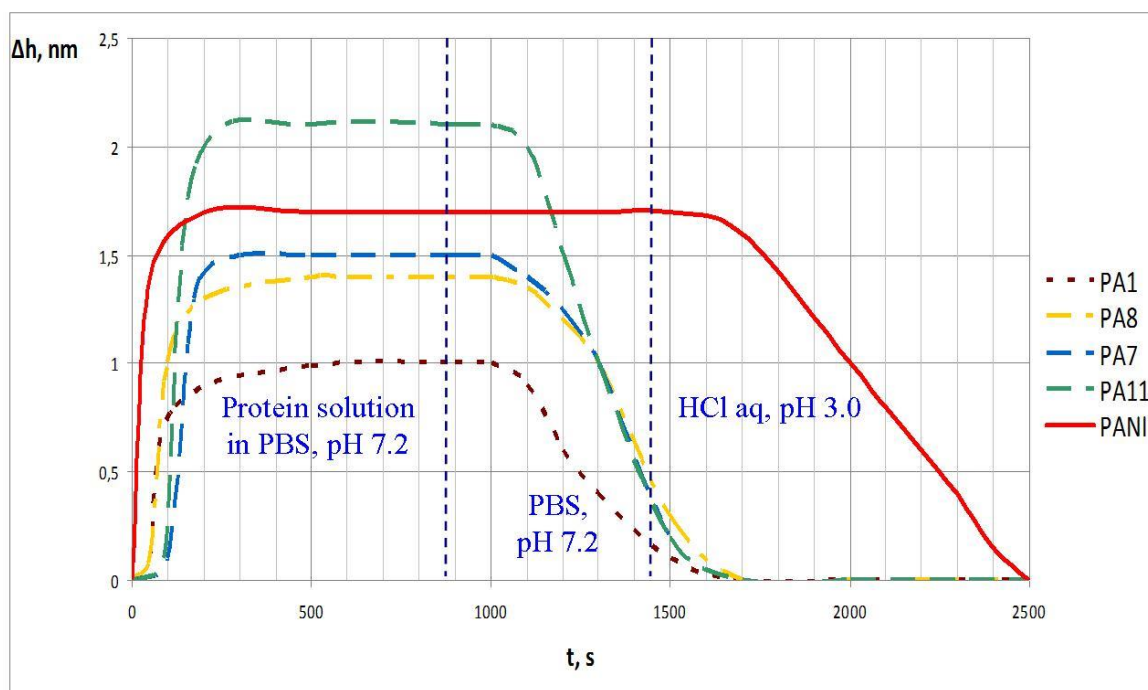


Рисунок 3.13 - Динамика сорбции БСА на поверхности стеклянных пластинок, модифицированных полиарамидами РА1, РА7, РА8, РА11 и ПАНИ (скорость потока 15 мкл/мин) [344].

Несмотря на различия в толщине образующихся слоев, во всех рассмотренных случаях, по-видимому, формируется мономолекулярный белковый слой, что следует из сравнения эффективных гидродинамических радиусов исследованных белков (~ 7 нм для БСА и ~ 2.2 нм для лизоцима) с учетом их молекулярных масс, числа аминокислотных остатков в составе полипептидной цепи и наличия четвертичной структуры у БСА. Наблюдаемые на сенсограммах различия в толщине слоя являются, по-видимому, результатом денатурации макромолекул сорбата при сорбции на поверхности подложки, сопровождаемой изменением их конформации из-за

разрушения гидратной оболочки и деградации четвертичной структуры (в случае БСА).

Из Рисунка 3.13 видно, что сорбция БСА протекает быстро, достигая максимального значения через 1.5 - 4 мин. На ПАНИ-поверхности насыщенный адсорбционный слой ($h = 1.65$ нм) образуется уже через 1.5 мин, на РА7-поверхности ($h = 1.5$) – за 4 мин. На поверхностях, модифицированных полимерами РА8 и РА11, молекулы БСА формируют насыщенные адсорбционные слои ($h = 1.4$ и 2.1 нм, соответственно) примерно за 2 мин. Однако при дальнейшем пропускании того же буферного раствора над пластинами с полиарамидными покрытиями практически весь белок десорбируется, в результате чего наблюдается резкое уменьшение сигнала. Как и ожидалось, слабо заряженные в данных условиях макромолекулы БСА удерживаются на полиарамидной поверхности, по-видимому, за счет относительно слабых многоточечных контактов. При высокой концентрации белка в подвижной фазе и при относительно низкой скорости потока белковые молекулы формируют на поверхности полимерного покрытия адсорбционный слой, который затем разрушается и смывается с поверхности при прекращении подачи новых порций белка.

Обратимость сорбции белков была установлена в результате промывки поверхности модифицированной пластины чистой подвижной фазой и последующей повторной подачи белков (кроме пепсина), растворенных в подвижной фазе с нейтральным значением рН. Во всех случаях снова наблюдали формирование адсорбционного слоя белковых молекул.

Однако только при использовании ПАНИ-покрытия формируется устойчивый насыщенный адсорбционный слой молекул БСА, который удерживается на поверхности полимера при промывке буферным раствором при неизменном нейтральном значении рН. Белок начинает десорбироваться с поверхности ПАНИ только в результате понижения рН элюента (Рисунок 3.13). Аналогичный эффект наблюдали и в случае сорбции лизоцима на ПАНИ-поверхности (Рисунок 3.14). Таким образом, можно утверждать, что в нейтральной водной среде (оптимальной для выделения биополимеров) поверхности исследованных полиарамидов обладают более слабым сродством к белкам по сравнению с ПАНИ-поверхностью.

Экспериментальные данные, полученные с помощью метода СКИ, подтвердили наличие наиболее важного с практической точки зрения эффекта «негативной селекции», проявляющегося в том, что при подаче в кювету раствора *днДНК* адсорбционный слой не образуется ни в одном из исследованных случаев. Следовательно, как ПАНИ, так и полиарамиды проявляют близкую селективность при

сорбции ДНК и белков. Но в отличие от полиарамидных покрытий, ПАНИ-покрытие удерживает белки и при отсутствии подачи дополнительных порций молекул сорбата в кювету, а разрушение адсорбционного слоя происходит только в результате существенного понижения pH среды. На исследованных полиарамидных поверхностях белки в условиях проведенного эксперимента сорбируются обратимо. После промывки поверхности пластины подвижной фазой при повторной подаче растворов белков (кроме пепсина) во всех случаях снова формируется адсорбционный слой. Однако только на ПАНИ-покрытии при $\text{pH} > 3.0$ формируется устойчивый насыщенный адсорбционный слой БСА или лизоцима.

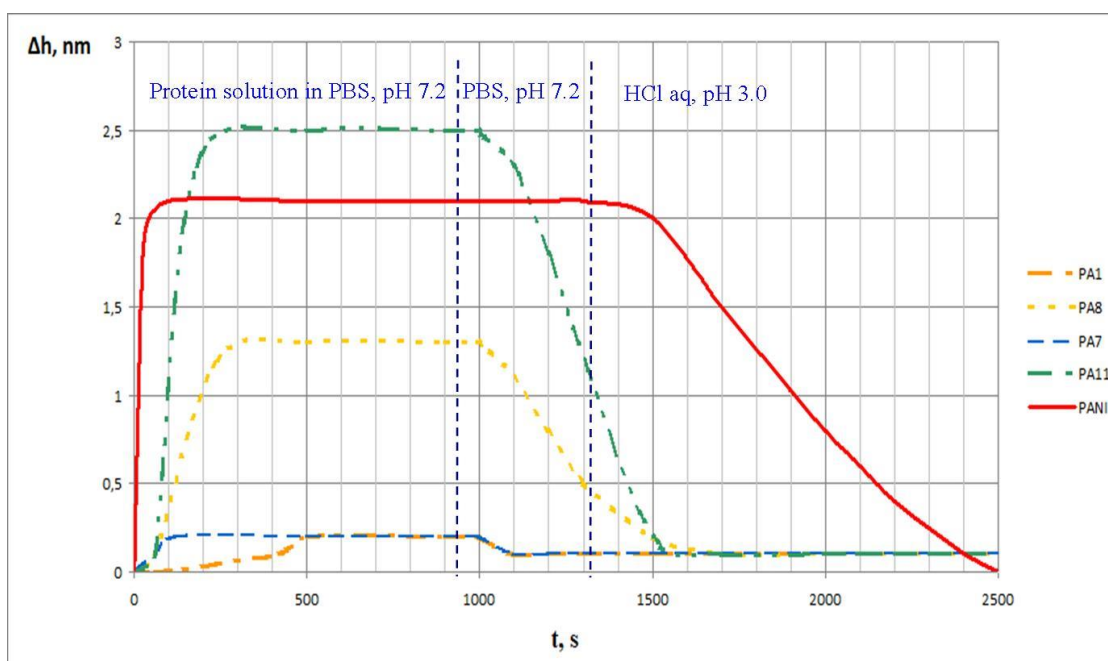


Рисунок 3.14 - Динамика сорбции лизоцима на поверхности стеклянных пластинок, модифицированных полиарамидами PA1, PA7, PA8, PA11 и ПАНИ (скорость потока 15 мкл/мин) [344].

С целью подтверждения сделанного вывода в Таблице 3.4 и на Рисунке 3.16 представлены результаты анализа хроматограмм аликвот лизата бактериальной культуры *E. coli* и элюатов, отобранных после пропускания этого лизата через картриджи, содержащие сорбенты на основе кремнезема, модифицированного ПАНИ, и кремнезема, модифицированного полимером PA8 (как наиболее близкого по химической структуре по сравнению с ПАНИ-покрытием).

Данные представлены в табличной форме для большей наглядности, поскольку на хроматограмме бактериального лизата - многокомпонентной биологической смеси - не удовлетворительно разрешены пики ДНК и РНК (Рисунок 3.15). Последнее

обстоятельство потребовало проведения расчета площади пиков с помощью программного обеспечения Chromea™ (Perkin Elmer, США).

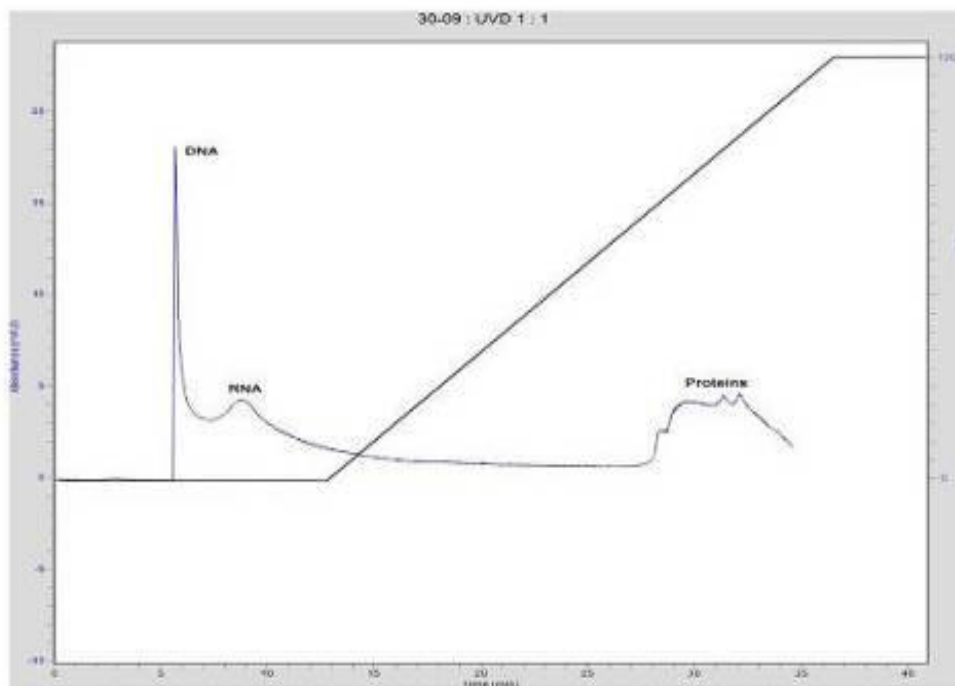


Рисунок 3.15 – Хроматограмма аликвоты бактериального лизата культуры *E. coli* (10^9 клеток/мл), полученная на SGX C-18 колонке (8 x 250 мм; 7 мкм). Скорость потока: 1 мл/мин. Элюент: вода - 12.5 мин, затем линейный градиент концентрации ацетонитрила (0 – 100% за 24 мин). Объем пробы - 10 мкл. Поглощение измеряли при 260 нм.

Из данных Таблицы 3.4 следует, что при хроматографии элюатов, полученных в результате выделения ДНК с помощью полученных композиционных сорбентов, в изократическом режиме появляются пики, относящиеся к ДНК, выходящей в составе исключенного объема. Затем с колонки выходит РНК (также в изократическом режиме), в то время как пики, относящиеся к белковой фракции, появляются только в условиях возрастающего градиента концентрации органического компонента в составе подвижной фазы при проведении хроматографии в обращенно-фазовом режиме.

Полученный результат подтверждает сделанное в начале исследования предположение о том, что фторполимер- и ПАНИ-содержащие материалы демонстрируют сходные сорбционные свойства.

Таблица 3.4 - Параметры хроматограмм лизата бактериальной культуры и элюатов, собранных после пропускания лизата через картриджи с ФП-ПАНИ- и РА8-сорбентами.

Время удерживания компонента биологической смеси от момента инъекции (для белковой фракции – временной интервал выхода с колонки), мин:				
		Образец		
		Лизат бактериальной культуры	Элюат после пропускания через ФП-ПАНИ-сорбент	Элюат после пропускания через РА8-сорбент
Компонент смеси	ДНК	6.0	6.0	6.0
	РНК	9.5	9.5	9.5
	Белковая фракция	29.5 – 38.0	29.5 – 35.0	28.5 – 35.0

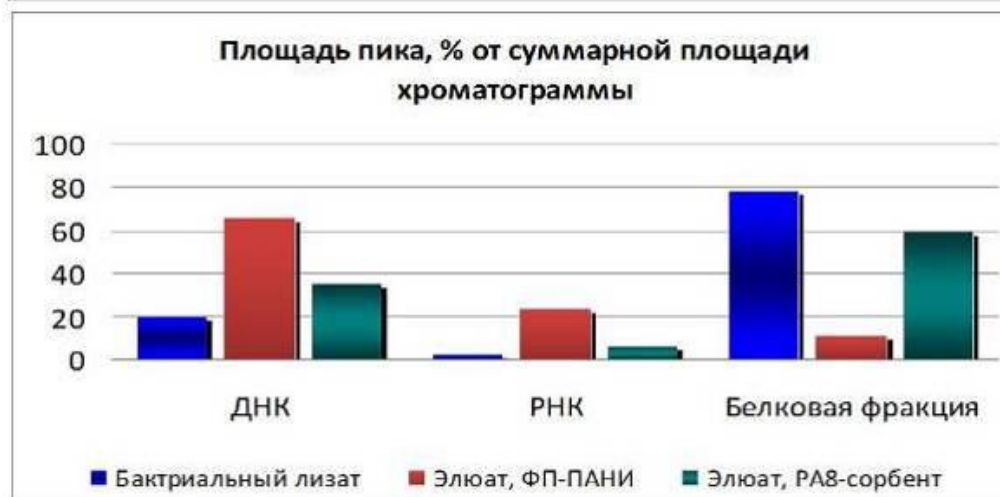


Рисунок 3.16 – Результаты хроматографии образцов лизата бактериальной культуры и элюатов, собранных после пропускания лизата через картриджи с ФП-ПАНИ- и РА8-сорбентами. Условия хроматографии указаны в подписи к Рисунку 3.10. Площади пиков рассчитывали с помощью программного обеспечения Chromea™.

Сопоставляя интенсивности и площади полученных пиков, можно судить о количественном содержании разделяемых компонентов в смеси, а времена удерживания компонентов нелишне сравнить при качественной оценке селективности полимерного покрытия сорбента. Из диаграмм на Рисунке 3.16 и из данных Таблицы 3.4 следует, что содержание бактериальной ДНК в элюате, полученном с использованием ПАНИ-модифицированного сорбента, выше, чем при использовании РА8-материала. В то же время в элюате, отобранном в результате использования РА8-сорбента, присутствует значительно больше белков, чем при использовании ПАНИ-сорбента, хотя содержание белков после применения РА8-сорбента также заметно уменьшается по сравнению с их содержанием в исходном лизате.

Следует объяснить некоторые различия, наблюдаемые при сорбции биополимеров в статическом и динамическом режимах. Так, сравнивая данные, полученные в результате статической и динамической сорбции белков (Таблица 3.3), можно видеть, что кислый белок пепсин эффективно удерживается всеми исследованными сорбентами, в то время как при исследовании методом СКИ в режиме реального времени адсорбционный слой пепсина на всех исследованных полимерных 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 сорбентов, наличие которых подтверждено для всех исследованных образцов (Таблица 3.3).

Эксклюзионный эффект, по-видимому, лежит и в основе удерживания до 15% *дн*ДНК сорбентами с полимерными покрытиями, характеризующимися наличием сквозных пор. В этом случае сказывается влияние рельефа поверхности носителя, за счет чего имеет место физическое удерживание белковых молекул, что проявляется, в частности, в уменьшении степени очистки ДНК от БСА (когда величины отношения A_{260}/A_{280} оказываются ниже 1.5).

Несмотря на то, что исследованные полимерные покрытия при нейтральных значениях pH не удерживают пепсин, в целом это не умаляет способность разработанных композитов удерживать суммарную белковую фракцию. Это означает, что эффективность применения таких сорбентов для выделения ДНК и очистки ее от белков не снижается.

3.4. Вероятные механизмы сорбции НК и белков на исследованных сорбентах

Мы рассмотрели приведенные в Таблице 3.3 значения выхода НК и удерживания различных белков на поверхности исследованных модельных сорбентов. Видно, что 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 [346, 347], что 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 .

Сходство механизмов взаимодействия белков с полиарамидными и ПАНИ-покрытиями проявляется также в том, что БСА и лизоцим сорбируются, а кислый белок пепсин (как и днДНК) не удерживается на поверхности указанных полимеров.

В случае фторполимерсодержащих сорбентов вероятный вклад в сорбционные свойства 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 рН молекулы днДНК не удерживаются. РНК слабо удерживается и затем может быть элюирована в изократическом режиме. Удерживаемые компоненты белковой фракции затем также можно последовательно выделить в условиях градиента органического растворителя, аналогично тому, как это происходит при обращенно-фазовом разделении на С18-фазах. Полиамидные 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 значения рН подвижной фазы изменяются как заряд белковой молекулы, так и способность сорбционной поверхности образовывать водородные связи с молекулами сорбата. В результате протонирования атомов азота в макромолекуле ПАНИ белок десорбируется за счет разрушения водородных связей. Бóльшая толщина слоя молекул БСА на РА11-покрытии по сравнению с РА8-покрытием, вероятно, является следствием наличия в структуре РА11-покрытия электронакцепторной 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). Это предположение подтверждается эффективным удерживанием положительно заряженного в условиях проведения эксперимента лизоцима на РА11-поверхности (толщина слоя ~ 2.5 нм).

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

3.5. Выводы из результатов исследования сорбционных свойств полимерных сорбентов

Анализ полученных результатов приводит к определенным выводам о сорбционных свойствах изучаемых полимерных модификаторов и содержащих их

материалов. Во-первых, из полученных результатов следует, что низкая сорбционная активность по отношению к НК и высокая по отношению к белкам присуща достаточно широкому кругу полимеров, структура которых характеризуется наличием таких элементов, как ароматический азот, фторсодержащие группы, а также донорные и акцепторные фрагменты. Таким образом, в отличие от сорбционных материалов, в определенных условиях удерживающих НК (таких как, например, полиэтиленимин [348, 349] или кремнеземы [20]) и не связывающих белки (например, кремнеземы, полипропилен [350] или полиакриламид [351]), композиты, модифицированные ФП, ПАНИ и некоторыми полиарамидами, ведут себя противоположным образом (Рисунок 3.17). Несмотря на присутствие в составе указанных полимеров сильно различающихся по химической структуре и свойствам функциональных групп и фрагментов, композиты, модифицированные покрытиями таких полимеров, проявляют аналогичное сорбционное поведение, в частности, все они обладают свойством одновременно не удерживать δ ДНК и обратимо связывать белки. Подбирая полимерный модификатор с соответствующей химической структурой, можно решать конкретные задачи по селективному выделению целевых 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 слоя в составе сорбента, так и от природы молекул сорбата, и в значительно меньшей степени – от морфологии поверхности сорбента.

Во-вторых, из всех исследованных полимермодифицированных материалов наиболее полезными с практической точки зрения представляются фторполимер- и ПАНИ-содержащие сорбенты. В частности, ФП-ПАНИ-сорбент обеспечивает более эффективную очистку ДНК от белков и характеризуется более высоким сродством к белкам в нейтральной среде (оптимальной для выделения биополимеров) по сравнению с сорбентами, модифицированными полиарамидами. ПАНИ-поверхность одинаково быстро и эффективно удерживает белки с различными значениями pI . Кроме того, использование ПАНИ-покрытий обеспечивает принципиальную возможность последовательно выделять компоненты сорбированной белковой фракции, изменяя pH элюента в процессе пробоподготовки после этапа выделения ДНК. Таким образом, ПАНИ-сорбенты наряду с фторполимерсодержащими сорбентами следует рассматривать в качестве наиболее перспективных материалов для использования в пробоподготовке в молекулярной диагностике.

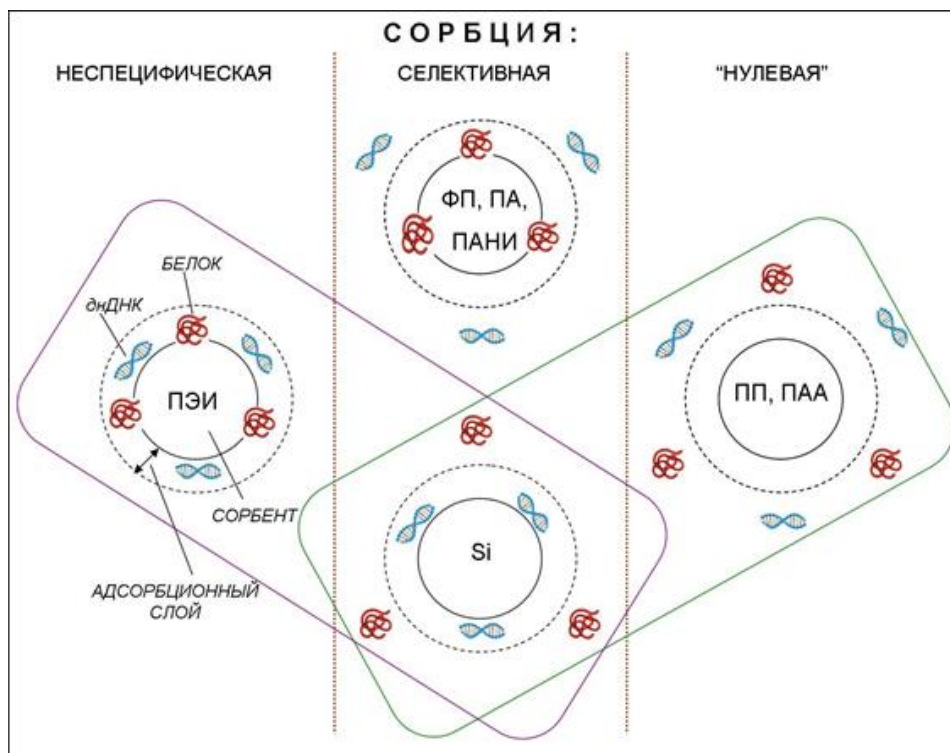


Рисунок 3.17 - Примеры возможных типов сорбции биополимеров (НК и белков) на различных материалах: ПЭИ – полиэтиленимины, ФП - фторполимеры, ПА – полиарамиды, ПАНИ – полианилины, ПП – полипропилен, ПАА – полиакриламид, Si – кремнезем.

В-третьих, сорбционные свойства исследованных материалов определяются суммарным вкладом различных механизмов сорбции, происходящей в результате гидрофобных взаимодействий, ионных взаимодействий и образования водородных связей. Зная химическую структуру полимерного покрытия композиционного сорбента, можно уверенно предсказывать его сорбционные свойства в условиях разделения смесей НК и белков. С другой стороны, это означает, что для получения одинакового хроматографического эффекта при разделении смесей, содержащих НК и белки, можно использовать сорбенты, обработанные различными по химической структуре полимерными модификаторами (фторполимеры, полиарамиды и/или ПАНИ), демонстрирующими эффект «*негативной селекции*» в отношении НК.

Наконец, результаты хроматографического анализа, как и ожидалось, хорошо коррелируют с данными, полученными в режиме реального времени с помощью метода СКИ, адаптированного к задачам настоящего исследования. Использование метода СКИ при сравнительной оценке сорбционных свойств полимерных покрытий

позволило существенно понизить трудоемкость, стоимость и время, требуемое на проведение исследования (в первую очередь, по сравнению с методом ВЭЖХ).

Получаемые данные позволяют заранее с высокой степенью достоверности оценивать эффективность применения композиционного сорбента известного состава для решения конкретной практической задачи, а также расширять область применения получаемых материалов в исследовательской практике и в клинической диагностике, что будет продемонстрировано в Главе 5.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧНЫХ СПОСОБОВ СИНТЕЗА ПОЛИМЕРСОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИТОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ БИОПОЛИМЕРОВ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛУЧЕННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ ПОКРЫТИЙ

Анализ научной литературы (Глава 1) позволил сделать следующие заключения. Во-первых, наиболее эффективные из известных методов выделения НК из биологических образцов (включая методы пробоподготовки с использованием широко применяемых коммерческих наборов) основаны на использовании твердофазной экстракции с применением разнообразных сорбентов. Важно отметить, что применяемые в этих методах сорбенты демонстрируют эффект *«позитивной селекции»* в отношении НК. На наш взгляд, более перспективными должны оказаться материалы, обеспечивающие одностадийное выделение НК из биологических смесей. Эти материалы не должны удерживать выделяемую НК, но одновременно должны удерживать прочие компоненты смеси. Речь идет о материалах, демонстрирующих эффект *«негативной селекции»* в отношении НК.

Во-вторых, известно лишь небольшое число перфторполимеров или перфторполимерсодержащих материалов (таких как ПТФЭ-частицы [234-236] или композиты на основе кремнеземов, поверхностно модифицированных нанослоями ПТФЭ [136, 231-233]), принципиально пригодных для одностадийного выделения НК - т. е. для реализации протоколов выделения, при использовании которых НК не удерживаются сорбентом, в то время как другие компоненты биологического образца (смеси) эффективно сорбируются. Получение таких материалов сопряжено с серьезными технологическими трудностями, обусловленными необходимостью в использовании источника γ -радиации, вакуумной и криотехники и т.д.

В-третьих, кроме фторсодержащих полимеров перспективным полимерным модификатором для синтеза материалов, предназначенных для одностадийного выделения НК, в силу ряда причин представляется ПАНИ. Материалы с ПАНИ-покрытиями проявляют высокую селективность при разделении молекул газов и при сорбции ионов металлов (хотя и отсутствуют данные об использовании ПАНИ-покрытий для селективной сорбции биополимеров). Кроме того, состав поверхностного слоя ПАНИ-покрытия (следовательно, его сорбционные свойства) можно направленно и обратимо изменять в зависимости от pH среды. Наконец, стабильные ПАНИ-покрытия на поверхности твердых носителей различной природы удается получать в мягких условиях.

Таким образом, актуальность поиска новых полимерсодержащих материалов, обеспечивающих одностадийное выделение препаратов НК из биологических образцов, а также разработка несложных и масштабируемых технологий их получения не вызывают сомнений.

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

Постановка задачи, вынесенной в название Главы 4, определяется несколькими условиями. Помимо обоснованного выбора исходных материалов (включая реагенты, необходимые для осуществления макромолекулярной реакции) и условий, обеспечивающих формирование желаемой наноструктуры покрытия (с учетом требований конкретной применяемой технологии) при получении стабильных и функциональных полимерных нанопокровов также следует учитывать дополнительные требования.

Во-первых, материалы, совместимые с биомacroмолекулами, в частности, хроматографические сорбенты для биосепарации и биоанализа, носители для иммобилизации биолигандов и получения биокатализаторов, биосенсоры и др., должны обеспечивать эффективное взаимодействие с биологическими наноразмерными объектами (молекулами и частицами). С другой стороны, структурно-функциональные свойства таких материалов должны отвечать современной тенденции в развитии биоаналитических систем в направлении миниатюризации и автоматизации [352].

Подобные системы могут быть созданы на базе различных пористых, капиллярных или плоских твердых матриц (носителей). Носители из полимерных материалов, как правило, обеспечивают высокую химическую стойкость, заданные адсорбционные свойства, наличие необходимых функциональных (якорных) групп, биосовместимость, но в то же время они не всегда обладают достаточной жесткостью (и ненабухаемостью), а также не обеспечивают возможность получения структурно-однородных мезопористых систем с диаметром пор ~ 10 – 100 нм. Неорганические матрицы (например, на основе оксидов кремния, алюминия, циркония и др.), напротив, представляют собой морфологически совершенные жесткие мезопористые или непористые каркасные структуры, но не обеспечивают желаемого химического разнообразия структуры поверхностного слоя, наличия необходимых

функциональных групп, отличаются высоким уровнем неспецифической сорбции биологических молекул и частиц. При этом неорганические носители химически нестабильны, особенно при экстремальных значениях рН среды. Широко применяемые приемы модифицирования поверхности неорганических матриц кремнийорганическими соединениями (и другими низкомолекулярными модификаторами) [113] лишь частично устраняет эти недостатки.

Нами предложен подход, позволяющий сочетать в одном материале преимущества неорганических и органических полимерных материалов [353]. Суть его состоит в нанесении сплошных равномерно распределенных полимерных нанослоев (толщиной 2 – 10 нм) требуемой химической структуры на поверхность твердых матриц с получением нанокомпозитного 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 роли такой матрицы могут быть использованы объемно-пористые частицы, синтетические мембраны, капилляры и др. Выбор матрицы определяется назначением получаемого композита. Прямой синтез таких нанокомпозитов предполагает, что реакции синтеза макромолекул будут сопровождаться образованием однородных полимерных нанопокровов, прочно (химически) связанных с поверхностью носителя, в том числе с внутренней поверхностью пор. В большинстве случаев для этого следует предварительно тем или иным способом активировать поверхность носителя.

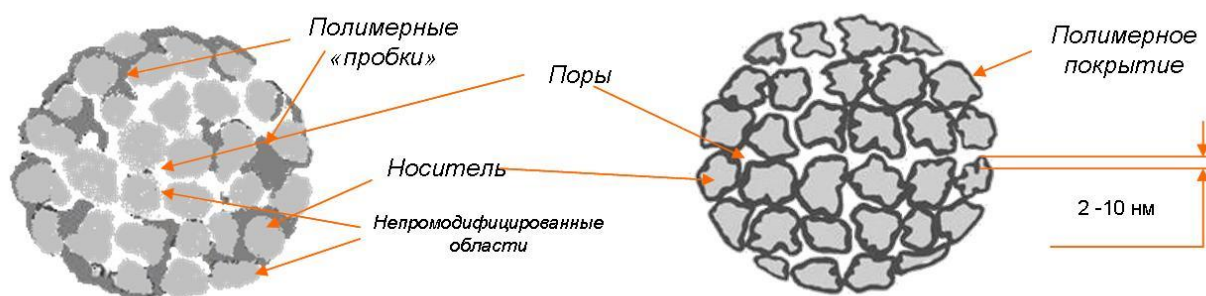


Рисунок 4.1 – Морфология композиционных полимерсодержащих сорбентов. Полимерное покрытие должно быть тонким и равномерно распределенным по поверхности носителя, обеспечивая снижение неспецифической сорбции и повышение химической стабильности композиционного сорбента. При этом значения внутреннего диаметра и объема пор носителя не должны значительно уменьшаться [352].

Структура такого полимер-модифицированного пористого композита по сравнению с морфологически менее совершенным композитом того же брутто-состава схематически представлена на Рисунке 4.1 на примере частицы объемно-пористого дисперсного материала. Из рисунка видно, что использование матрицы с неактивированной поверхностью (структура слева) способствует образованию неоднородного и неравномерно распределенного по поверхности носителя покрытия (с полимерными «пробками» в просветах пор и наличием непокрытых участков), что приводит к снижению селективности сорбции, уменьшению химической стойкости материала подложки и к усилению нежелательной неспецифической сорбции. Напротив, можно ожидать, что использование носителя с активированной поверхностью (структура справа), позволит получать химически стойкие высокоселективные полимерсодержащие композиты с низким уровнем неспецифической сорбции, которые (за счет сохранения пористости исходной матрицы) будут отличаться высокой удельной площадью поверхности и однородным распределением поверхностных функциональных групп, что обеспечит интенсификацию поверхностных сорбционных и/или химических процессов.

Прежде, чем приступить к обсуждению полученных результатов, важно еще раз подчеркнуть, что полезное с биотехнологической точки зрения сорбционное поведение демонстрируют различные полимерные материалы, однако в силу особенностей синтеза и физико-химических свойств такие полимеры сами по себе, как правило, нельзя рассматривать в качестве «хороших» сорбентов. Практическое решение было найдено в использовании подходящих твердых носителей, модифицированных равномерно нанесенными полимерными нанопокрывтиями, получаемыми в результате процессов с участием макромолекул, в том числе макромолекулярных реакций в поверхностных нанотолщинных слоях носителя. Это означает, что наряду с решением «обычных» химических проблем, возникающих при синтезе макромолекул, в процессе получения таких композитов необходимо обеспечить выполнение следующих 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 (Рисунок 4.1); наконец (3), следует стремиться к разработке «универсального» метода синтеза, позволяющего реализовывать воспроизводимые протоколы синтеза, пригодные для химически различных систем.

Для модификации пористых матриц нанослоями полимеров мы использовали различные макромолекулярные реакции в поверхностных слоях твердых матриц и различные по химической структуре мономеры, олигомеры и активированные полимеры, которые подробно описаны в соответствующих подразделах диссертации. Выбор полимерного модификатора определялся его химическим строением с учетом потенциальных характеристик получаемого композита, непосредственно взаимодействующего с биологическими молекулами и/или частицами. Реакции, используемые для синтеза соответствующих композитов, включали гомо- и сополимеризацию с раскрытием двойной связи виниловых мономеров (тетрафторэтилена, трифторстирола и др. мономеров), отверждение олигомеров (фторирование олигомеров бутадиена [137, 353]), окислительную (со)полимеризацию анилина (и/или замещенных анилинов) [354-356], физическую сорбцию растворимых фторполимеров и полиарамидов в сочетании с ультразвуковой обработкой [353, 357, 358], хемосорбцию реакционноспособных макромолекул [359, 360] на твердых поверхностях. В последнем случае после химической иммобилизации макромолекул полимерного модификатора на твердой поверхности количество остаточных активированных групп, которые могут быть использованы для введения в хемосорбированные макромолекулы различных заместителей, может составлять до 90% от исходного количества [361]. В рамках исследования также предполагалось показать, что из одной и той же «базовой» матрицы можно получать широкий набор полимерсодержащих материалов с различным гидрофильно-липофильным балансом, с различными ионогенными группами, а также материалов, содержащих связанные на полимерных спейсерах биолиганды.

4.1. Разработка технологичных способов получения ПФБД-, ФП-, полиарамид- и ПАНИ-содержащих композиционных сорбентов

В результате проведенных исследований были разработаны новые технологичные подходы (способы) к получению композиционных материалов с нанотолщинными равномерно распределенными по поверхности носителя устойчивыми полимерными покрытиями. Разработанные способы удобно формально подразделить на две группы.

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

К *первой группе* мы отнесли способы, в которых композит с полимерным нанопокрытием получают в результате полимеризации мономера *в присутствии неактивированного носителя*. К этой группе также следует отнести такие способы, когда слой готового *прекурсора* (олигомера или полимера) предварительно наносят на поверхность носителя в результате «кастинга» (формирования олиго- или полимерного покрытия на твердой поверхности в результате удаления растворителя из системы, содержащей раствор полимера и частицы носителя), а затем иммобилизуют 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 нанослоя

Из Главы 1 (Обзор литературы) становится вполне ясно, что ПАНИ-покрытия могут быть получены методом окислительной осадительной полимеризации анилина на поверхности твердых носителей различной природы. Процесс отличается наличием индукционного периода, автокаталитическим характером (что подтверждается изучением кинетики полимеризации) и в ряде случаев сопровождается замедлением и завершением реакции еще до полного исчерпания мономера (анилина).

Для сравнительной оценки влияния природы поверхности носителя при получении ПАНИ-содержащих композитов на полимеризацию анилина мы исследовали кинетику этой реакции в присутствии носителей, различающихся кислотностью поверхности. В качестве носителей использовали частицы оксида алюминия (содержащие льюисовские кислотные центры), сшитые полистирольные сульфированные катионообменные смолы (КУ-2 и Dowex – т. е. кислоты Брэнстеда), а также нейтральные в условиях проведения эксперимента кремнеземные частицы марки МПС-1150 (мы предполагали, что кремнезем окажется наиболее перспективным носителем для разработки технологичных способов получения ПАНИ-содержащих композитов, принимая во внимание особенности его морфологии, жесткость и ненабухаемость в присутствии органических растворителей). Детали этого исследования приведены, в частности, в [138].

Как известно (Глава 1), при полимеризации анилина в кислых условиях в отсутствие носителя кинетическая кривая процесса имеет S-образную форму. Это утверждение легко подтвердить экспериментально, одновременно строя кинетические кривые полимеризации анилина по убыли мономера в реакционной смеси и по приросту массы образующегося полимера (Рисунок 4.2).

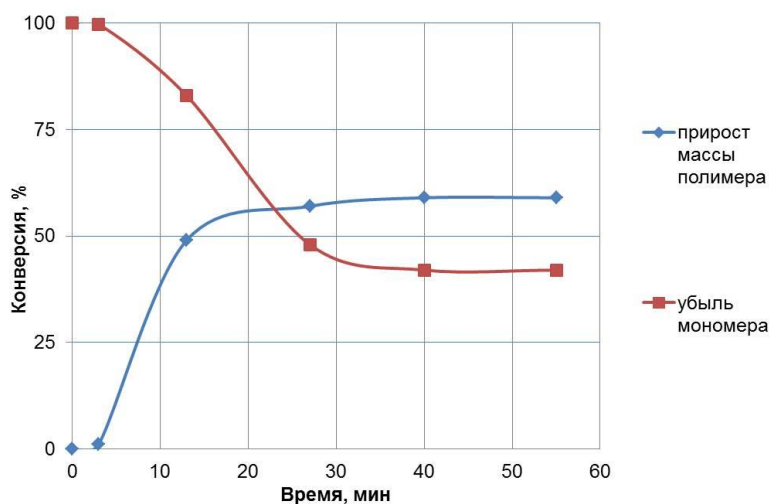


Рисунок 4.2 - Прирост массы ПАНИ и убыль мономера в процессе полимеризации анилина в отсутствие носителя при соотношении мономер:кислота:окислитель 1:3:1. Начальная концентрация анилина - $0.02 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$.

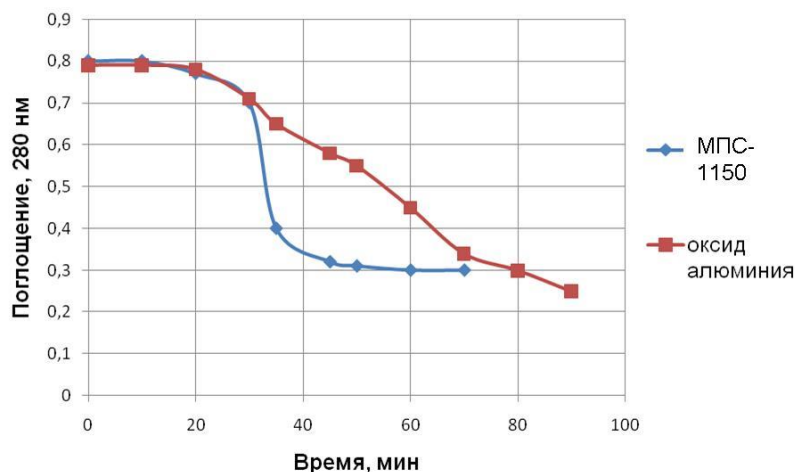


Рисунок 4.3 – Полимеризации анилина в присутствии частиц МПС-1150 и частиц оксида алюминия. Условия полимеризации аналогичны условиям на Рисунке 4.2.

Сходство форм полученных кривых (и отсутствие в спектрах поглощения реакционной смеси пиков, соответствующих поглощению олигомеров анилина [138]), подтверждает, что при мольном соотношении реагентов 1:3:1 концентрации промежуточных низкомолекулярных продуктов незначительны.

Из сравнения кинетических кривых полимеризации анилина, полученных в результате спектрофотометрической регистрации убыли мономера в присутствии кремнеземных частиц МПС-1150 и оксида алюминия становится очевидным, что внесение субстрата (носителя) в реакционную смесь в определенных случаях может приводить к изменению формы кинетической кривой полимеризации анилина. Так, при использовании оксида алюминия (Рисунок 4.3) форма кинетической кривой заметно изменяется, что свидетельствует о существенном влиянии поверхности этого носителя на структуру образующихся макромолекул ПАНИ. Механизм полимеризации анилина, как и структуры ПАНИ, образующиеся в различных условиях, подробно обсуждались в работах, цитированных в Главе 1. В настоящем исследовании было необходимо показать, что носители могут оказывать различное влияние на ход полимеризации анилина в зависимости от химической природы носителя.

Так, внесение в реакционную смесь частиц катионообменных смол (Рисунок 4.4) приводило к сокращению индукционного периода на порядок (до 1 мин) по сравнению с 10-минутным (и более) индукционным периодом при полимеризации в отсутствие носителя или в присутствии кремнезема (МПС-1150). Важно отметить, что в присутствии частиц катионообменных смол ПАНИ-покрытия формировались без добавления допанта (кислоты), а S-образная форма кинетической кривой в целом сохранялась.

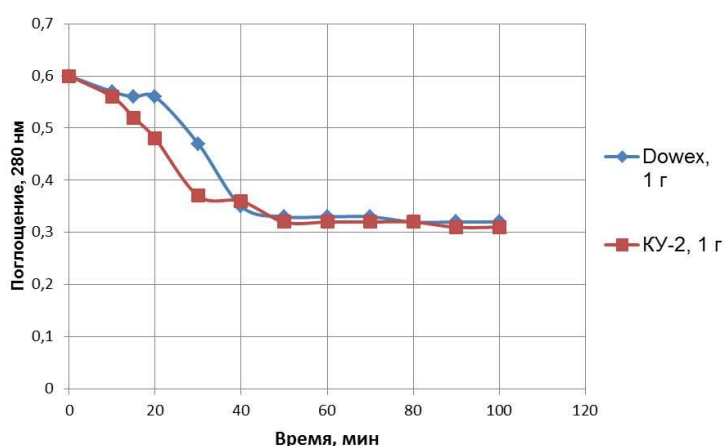


Рисунок 4.4 – Полимеризация анилина в присутствии частиц катионитов без добавления кислоты-допанта. Условия полимеризации аналогичны условиям, указанным на Рисунке 4.2.

Внесение в реакционную среду материала носителя, проявляющего активность в отношении анилина, также сказывалось на изменении рН реакционной среды в процессе полимеризации. Было 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. При использовании оксида алюминия рН понижался более чем на единицу, а при использовании Dowex - на 3 единицы. Таким образом, в последнем случае большую часть времени полимеризация протекала при значении рН=2, соответствующем значению рН реакционной смеси при полимеризации в присутствии соляной кислоты (Рисунок 4.5). Этот эффект вызван влиянием поверхности исследуемых носителей - оксида алюминия (кислота Льюиса) или катионитов (кислота Брэнстеда) - на образование ПАНИ-покрытия.

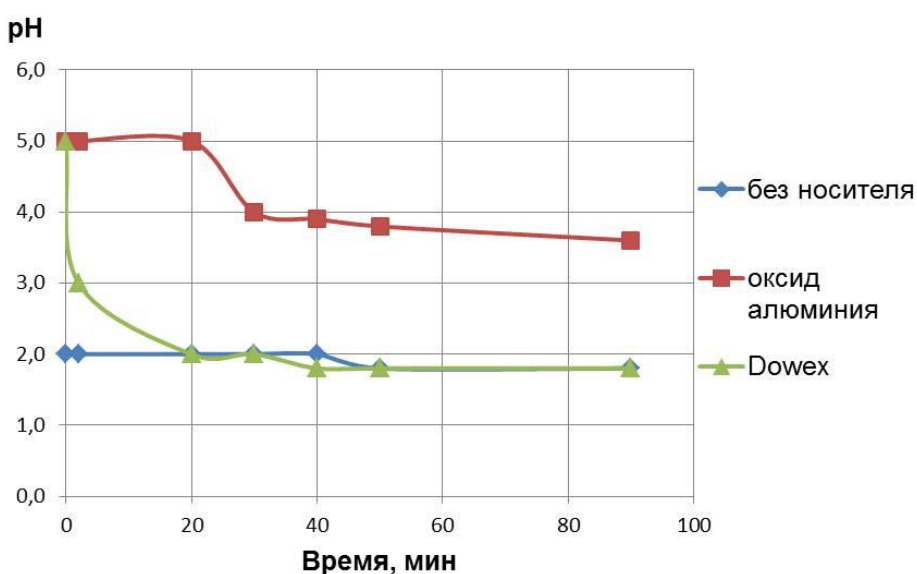


Рисунок 4.5 – Изменение рН реакционной смеси при полимеризации анилина в отсутствие носителя и в присутствии оксида алюминия и катионообменной смолы.

Присутствие частиц кремнезема (МПС-1150) практически не изменяло вид кинетической кривой, получаемой в отсутствие носителя. Это означает, что на поверхностных силанольных группах кремнезема в кислой среде образующиеся в начальной стадии полимеризации низкомолекулярные продукты полимеризации анилина не удерживаются.

В результате на поверхности кремнезема образуется ПАНИ-покрытие, но одновременно до 60% введенного в реакционную смесь анилина расходуется на образование взвеси полимерных частиц в реакционном объеме. Затем эти частицы оседают на поверхность ПАНИ-модифицированного носителя, слабо удерживаясь на ней и загрязняя сорбент, что весьма существенно усложняет процедуру его отмывки.

S-образная форма кинетической кривой полимеризации анилина указывает на автокаталитический характер процесса [263 и др.], доказательством чему является

изменение формы кинетической кривой полимеризации анилина в результате добавления в реакционную смесь навески частиц ПАНИ непосредственно после смешивания растворов мономера и окислителя (Рисунок 4.6).

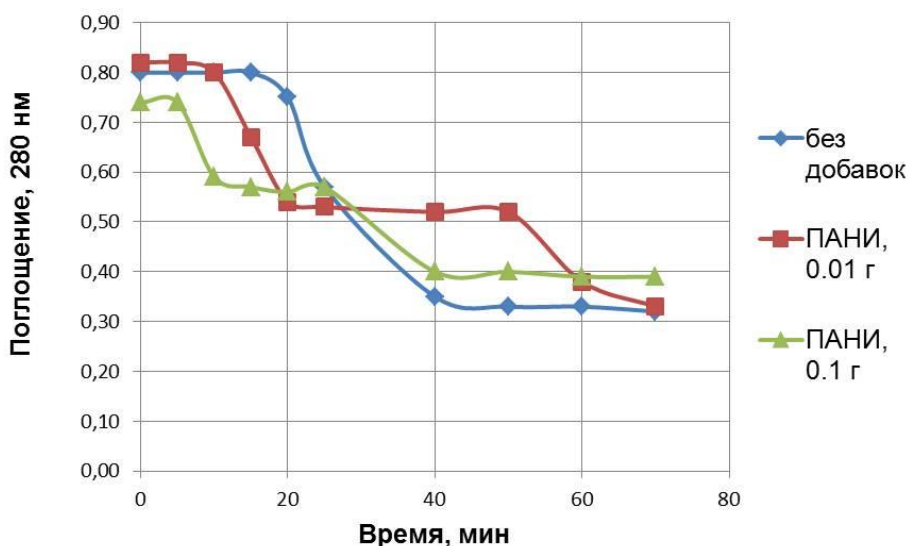


Рисунок 4.6 – Полимеризация анилина при добавлении частиц ПАНИ (соотношение мономер:кислота:окислитель - 1:3:1; начальная концентрация анилина 0,02 М).

Добавление частиц ПАНИ приводит к сокращению индукционного периода, а на кривой появляется вторая ступень. Продолжительность индукционного периода сокращается прямо пропорционально массе внесенного ПАНИ. Каталитическое действие внесенного полимера на процесс полимеризации, по-видимому, определяется тем, что электронные переносы, приводящие к образованию катион-радикалов анилиниума, происходят на поверхности внесенных ПАНИ-частиц, поэтому скорость полимеризации в начале процесса растет. Последующее замедление скорости полимеризации проявляется в появлении «ступени» на кривой, что связано с прекращением эффективного каталитического действия добавленных частиц ПАНИ по мере их "зарастания" новыми образующимися макромолекулами. Затем полимеризация продолжается преимущественно на частицах "свежего" ПАНИ, образующихся в объеме реакционной смеси.

Таким образом, присутствие твердых частиц в реакционной системе при полимеризации анилина (как специально добавленных частиц ПАНИ, так и привнесенных частиц носителя иной природы) оказывает влияние на кинетику полимеризации (Рисунки 4.3 – 4.6). Степень и результат этого влияния зависят от природы поверхности добавляемого носителя. Исключением является кремнезем, не

оказывающий каталитического воздействия на полимеризацию анилина в кислой среде, что дает возможность получать ПАНИ-содержащие композиты с заданной морфологией полимерного покрытия, которая будет определяться условиями проведения процесса, а не свойствами поверхности носителя. Однако отсутствие влияния поверхности носителя на полимеризацию анилина приводит к параллельному протеканию полимеризации на поверхности и в объеме реакционной смеси. При использовании МПС-1150 до 60% мономера расходовалось на образование взвеси полимерных частиц в объеме реакционной смеси.

Проведенные эксперименты подтвердили возможность получения сплошных ПАНИ-покрытий на твердых поверхностях различной природы в результате окислительной осадительной полимеризации анилина. В частности, было показано, что при использовании поверхностей, представляющих собой поликислоты (катионообменные смолы), мономер расходуется преимущественно на образование ПАНИ-покрытия, а не на образование взвеси полимерных частиц в объеме реакционной среды. Из представленных результатов также следует, что при полимеризации анилина в присутствии твердого носителя важно вначале обеспечить условия для получения первого слоя ПАНИ, а образование последующих слоев будет катализироваться предыдущими слоями. Тем не менее, существует, по крайней мере, один путь для локализации процесса формирования ПАНИ-макромолекул на поверхности носителя - использование носителей с кислотными поверхностными группами.

Таким образом, очевидна необходимость в разработке технологичных и масштабируемых способов получения ПАНИ-содержащих композиционных сорбентов в условиях, когда не менее 90% мономера будет расходоваться на формирование нанотолщинных ПАНИ-покрытий на поверхности носителя за счет локализации процесса полимеризации на поверхности носителя. Такие способы были разработаны в результате проведенных исследований.

4.1.1.2. Получение композиционных полимерсодержащих сорбентов методом кастинга

Для нанесения на поверхность твердых носителей сплошных нанотолщинных слоев полимеров, растворимых в подходящих растворителях, был использован метод «кастинга», предварительно модифицированный для повышения эффективности формирования покрытий на объемно-пористых носителях.

Метод кастинга применяли для нанесения равномерно распределенного по поверхности объемно-пористого жесткого носителя слоя олигобутадиена с целью получения фторированного полифторбутадиенового покрытия [137, 353] в качестве альтернативы ПТФЭ-покрытию (см. подраздел 3.1.1.3).

Аналогичный способ формирования полимерных покрытий из растворов полимеров был использован с целью получения сорбентов, модифицированных покрытиями серии полиарамидов с различной химической структурой, которые были использовали при исследовании механизмов сорбции биополимеров на поверхности полученных сорбентов (Глава 3). Метод кастинга также применяли при нанесении покрытия фторопласта-42Л на поверхность кремнезема. Полученный материал использовали в качестве носителя при получении ФП-ПАНИ-сорбента, а также для выделения производных витаминов из образцов цельной крови (Глава 5). Этот метод также был использован при получении фторполимерсодержащих носителей на основе кремнезема для твердофазного синтеза олигонуклеотидов (Глава 5).

4.1.1.2.1. Получение ПФБД-содержащего сорбента методом кастинга с последующим фторированием

Олигобутадиены в качестве основы для создания фторполимерного нанотолщинного покрытия на кремнеземной поверхности были выбраны нами не случайно. Эти вещества доступны, образуют тонкие покрытия в результате физической сорбции на неорганических поверхностях и легко подвергаются химической модификации. В исследовании были использованы коммерческие образцы олигобутадиенов, содержащие 1,4-цис-, 1,4-транс- и 1,2-звенья с M_n 4500, 5000 и 10000. Были известны работы [362, 363], в которых обсуждались результаты нанесения полибутадиенового покрытия на поверхность пористых и непористых силикагелей. Авторы этих работ пришли к выводу о том, что на поверхности пористых силикагелей не удастся получить равномерно распределенную полибутадиеновую пленку. Тем не менее, они не исключали возможность образования сплошного тонкого полибутадиенового покрытия на кремнеземной поверхности, поскольку при разделении смеси пептидов с использованием модифицированных полибутадиеном кремнеземов неспецифическая сорбция оказалась значительно ниже, чем при использовании немодифицированных силикагелей. Авторы упомянутых работ также показали, что полибутадиен способен

образовывать сплошные пленки различной толщины на поверхности непористых силикагелей в результате физической сорбции.

Для формирования на поверхности пористого носителя равномерно распределенного сплошного полимерного покрытия необходимо обеспечить условия, при которых значительная доля присутствующих в растворе полимерных (олигомерных) молекул будет способна проникать во внутренний объем пор носителя. Этому способствуют как жесткость и ненабухаемость каркаса носителя, так и отсутствие электростатического или аффинного взаимодействия растворенных молекул с поверхностью. Очевидно также, что в значительной мере способность макромолекулы проникать в поры носителя определяется размером макромолекулы в растворе, который возрастает пропорционально увеличению молекулярной массы.

Среднее время t , необходимое для сорбции макромолекулы (в частности, молекулы олигобутадиена) в результате диффузии в пору носителя радиусом R , можно оценить, зная гидродинамический радиус и коэффициент поступательной диффузии D_o макромолекулы:

$$t = R^2 / (15D_o).$$

Коэффициент поступательной диффузии D_o определяется из уравнения Цветкова-Кленина [364]:

$$D_o = A_o T / \{ \eta_o (M [\eta])^{1/3} \},$$

где A_o - эмпирический коэффициент (для большинства известных полимеров в большинстве растворителей принят равным $3.4 \cdot 10^{-10}$ эрг/°С); T - абсолютная температура (принята равной 293 К); $\eta_o = 0.24$ Н·с/м² - вязкость чистого растворителя (*n*-пентан) определена по номограмме из [365]; M - молекулярная масса олигомера; $[\eta]$ - характеристическая вязкость раствора олигобутадиена, определяемая по уравнению Марка-Хаувинка-Флори [366]:

$$[\eta] = K_\eta M^\alpha.$$

Значения входящих в это уравнение констант зависят от конформации растворенной макромолекулы, от термодинамического качества растворителя и от температуры. Эти значения могут меняться в известных диапазонах: $K_\eta = 10^{-2} \div 10^{-5}$ дл/г, $\alpha = 0.5 \div 2.0$.

Уравнение Цветкова-Кленина справедливо для макромолекул, принимающих в растворе форму правильной сферы. Однако, поскольку значения t , вычисляемые с учетом указанных выше пограничных значений K_η и α , являются предельными величинами, не имело смысла дополнительно вычислять исправленный коэффициент диффузии для линейных цепей.

В подробном исследовании, проведенном Капустиным [137] при получении полибутадиенового покрытия, использовали кремнезем марки *GPB-500-TrisoporTM* со средним радиусом пор 26 нм. Было показано, что времена сорбции t , рассчитанные для олигобутадиена с M_n 4500, изменяются в зависимости от вязкости раствора в интервале от 20 с до 26 мин. Для олигобутадиена с M_n 10000 эти значения выше примерно на одну треть. Время контакта раствора олигобутадиена с частицами носителя в разработанном методе составляло 25 мин и, следовательно, покрывало практически весь диапазон значений, которые могут быть реально получены для использованных образцов олигобутадиенов. Расчетные значения времени сорбции позволили предположить, что частицы кремнезема с порами диаметром 500 нм окажутся высокопроницаемыми для молекул олигобутадиенов, что было подтверждено экспериментально.

Равномерность распределения покрытий олигобутадиена различной молекулярной массы по поверхности частиц кремнезема в зависимости от размера пор оценивали по результатам ртутной порометрии. Полученные значения уменьшения удельного объема и диаметра пор, а также примеры порограмм приведены в подразделе 3.3 при обсуждении характеристик полученных сорбентов. Использовали растворы олигобутадиена в *n*-пентане, содержащие олигомер в заранее рассчитанных количествах, необходимых для получения моно-, ди-, 3-, 5- и 10-молекулярных слоев, что при использовании в качестве носителя МПС марки *GPB-500-TrisoporTM* (с удельной поверхностью 88 м²/г) соответствовало нагрузкам 0.125, 0.25, 0.375, 0.625 и 1.25 г олигобутадиена на 1 г носителя, соответственно.

Данные ртутной порометрии показали, что исходный кремнезем *GPB-500-TrisoporTM* характеризуется удельным объемом пор 1.214 см³/г и средним диаметром пор 52 нм. Эти значения ожидаемо снижались при обработке носителя растворами олигобутадиена с M_n 4500, взятого в количестве, требуемом, например, для образования бимолекулярного слоя (до 0.912 и 49, соответственно), а также тримолекулярного слоя (до 0.553 и 47, соответственно). В результате обработки носителя олигобутадиеновым раствором с целью нанесения 10-молекулярного слоя открытые поры практически отсутствовали (удельный объем пор составил 0.017 см³/г при полимодальном распределении пор по размерам от 20 до 40 нм). При использовании олигомера с M_n 5000 наблюдали близкие изменения удельного объема и среднего диаметра пор.

Таким образом, наиболее равномерное распределение тонкого слоя олигомера по поверхности частиц носителя было достигнуто при использовании раствора,

содержащего олигомер в количестве, соответствующем по расчету образованию бимолекулярного слоя. Из полученных данных следует, что нанесение олигобутадиенов различной молекулярной массы в количествах, соответствующих по расчету получению бимолекулярного слоя, в случае низкомолекулярных образцов приводит к заметно меньшему изменению объема и диаметра пор по сравнению с исходным носителем, чем при нанесении высокомолекулярных образцов (M_n 10000). В последнем случае закупорка пор олигомерной фазой сопровождается значительным снижением удельного объема и среднего эффективного диаметра пор.

Эффективная толщина получаемого покрытия уменьшалась по мере снижения молекулярной массы олигомера. Использование олигобутадиена с M_n менее 4500 оказалось нецелесообразным из-за низкой вязкости их растворов в *n*-пентане, что приводило к неравномерному распределению олигомера по поверхности носителя при испарении растворителя после пропитки слоя кремнезема раствором олигомера. При использовании олигобутадиенов с M_n 4500 и 5000 отмечено уменьшение объема пор носителя на 25% вместо рассчитанных 15%. Этому можно дать следующее объяснение. Нефторированная фаза олигомера дополнительно не стабилизирована на поверхности носителя межмолекулярными связями, поэтому при проведении порометрии она, по-видимому, частично смещается ртутью во внутренний объем пор, образуя пробки в узких порах.

С целью стабилизации нанесенной на поверхность носителя олигомерной фазы и придания ей специфических сорбционных свойств, определяемых присутствием атомов фтора, покрытия подвергали фторированию. Известные подходы к созданию фторполимерсодержащих композиционных сорбентов, такие как γ -инициированная пост-полимеризация тетрафторэтилена на поверхности макропористых кремнеземов [136, 227-233], а также хемосорбция фторсодержащих сополимеров (в частности, трифторстиролсодержащих [135, 367]) на поверхности кремнеземов, подробно рассмотрены в литературном обзоре (Глава 1).

Альтернативные способы получения фторполимерсодержащих материалов основаны на обработке полимерных поверхностей молекулярным фтором [368]. При использовании таких технологий необходимо строго соблюдать меры техники безопасности, т. к. процесс фторирования взрывоопасен и проводится с применением высокотоксичных веществ. Стоимость получаемых в результате продуктов весьма высока.

Нельзя не отметить, что на момент постановки задачи настоящего исследования в научной литературе были описаны способы получения фторуглеродов

(и их производных) с использованием различных низкомолекулярных фторсодержащих соединений, которые обеспечивали замещение атомов водорода фтором (например, электролитическое фторирование или фторирование трифторидом кобальта CoF_3) [369]. С этой же целью применяли газообразные при комнатной температуре соединения (например, трифторметилгипофторит CF_3OF или перхлорилфторид ClO_3F), а также высокоселективные фторирующие агенты (такие как N-фторпиридиниевые соли, N-фторсульфамиды, CsSO_4F , ArIF_2), что позволяло проводить фторирование в мягких условиях. В результате чаще всего получали низкомолекулярные моно- и дифторпроизводные. Применение таких агентов в промышленном масштабе сопряжено с высокими затратами.

Более предпочтительным фторирующим агентом является дифторид ксенона, представляющий собой пожаробезопасное и устойчивое при нагревании до 500°C вещество. Возможность фторирования дифторидом ксенона в газовой фазе, в растворе или в водных дисперсиях поверхности пленок, полученных из непредельных углеводородов, была показана, например, в [370]. В этой работе продемонстрировано, что в результате фторирования пленок полидиенов толщиной 20 мкм вначале формируется поверхностный фторированный слой, а дальнейшее развитие процесса определяется диффузией реагентов в полимерную фазу.

В настоящем исследовании с целью получения фторполимерсодержащих композитов (сорбентов) для выделения и очистки биополимеров на поверхности носителя иммобилизовали тонкие покрытия олигобутадиена с M_n 4500 (с содержанием 1,4-цис- и 1,4-транс-звеньев – 80% и 1,2-звеньев – 20%) и затем фторировали их дифторидом ксенона. С целью повышения степени фторирования полимерной фазы был разработан способ фторирования парами дифторида ксенона значительно более тонких (толщиной 20-30 Å) покрытий олигобутадиена, чем в работе [370]. Покрытия предварительно наносили методом «кастинга» на поверхность частиц объемно-пористого кремнезема. Фторирование проводили в атмосфере аргона в условиях «псевдооживления» частиц носителя, пропуская пары XeF_2 через камеру, содержащую носитель. Этот прием позволил значительно сократить продолжительность процесса по сравнению с фторированием в растворе, поскольку диффузия молекул фторирующего агента в объем пор в газовой фазе происходит быстрее, чем в жидкости. Так, в работе [370] максимальная степень фторирования (определяемая по относительному привесу образца) составила 25% после 10-ти часовой обработки. Оптимальная же продолжительность фторирования в настоящем исследовании не превышала 3 ч.

Чтобы иметь возможность оценить преимущества разработанного метода по сравнению с известными ранее способами химического отверждения олигобутадиеновых покрытий, нанесенных на поверхность непористых и пористых силикагелей, необходимо кратко рассмотреть особенности этих методов. Например, в работах [371, 372] олигобутадиеновый слой отверждали, добавляя в систему пероксид дикумола (инициатор радикальной полимеризации), в результате чего в получаемом продукте содержались нежелательные низкомолекулярные примеси. Интересно рассмотреть последовательность манипуляций, проводимых авторами [371] для очистки продукта, полученного на основе непористого кремнезема, от непрореагировавшего олигомера и примесей. После отверждения полимерной фазы и удаления растворителя полученный материал в течение 4 ч выдерживали в атмосфере аргона при 170°C. На следующем этапе материал суспендировали в смеси диоксана с толуолом, взятых в равных объемах, и обрабатывали ультразвуком. На заключительном этапе сорбент отмывали различными растворителями.

Аналогичные манипуляции были проведены авторами [372] с целью получения полибутадиенсодержащего материала на основе пористого силикагеля. В результате был получен материал, гипотетическая структура которого представлена на Рисунке 4.7. Легко видеть, что объемно-пористая частица силикагеля снаружи покрыта очень тонким слоем полимера, а существенная доля внутреннего объема пор заполнена полимерными «пробками», в то время как не менее значительная доля внутреннего объема пор остается немодифицированной. Примечательно, что сами авторы упомянутых здесь работ отмечали, что поверхность пор следует считать предпочтительными участками для физической сорбции вязких гидрофобных жидкостей, в частности, олигобутадиена.

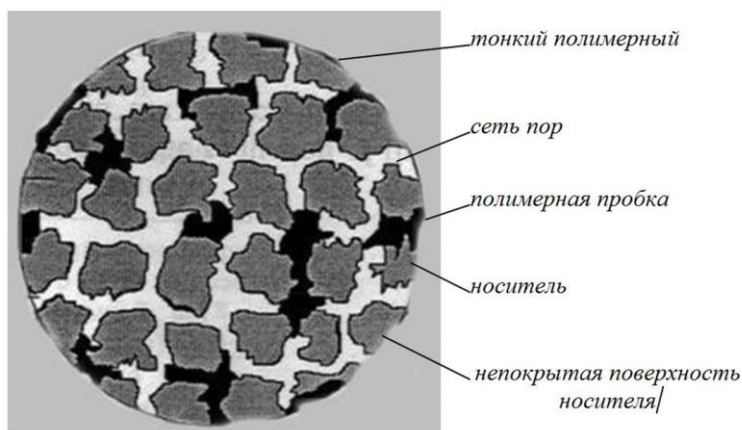


Рисунок 4.7 – Упрощенная схема распределения полимера в системе пор силикагеля *LiChrospher Si 300* (рисунок адаптирован из [372]).

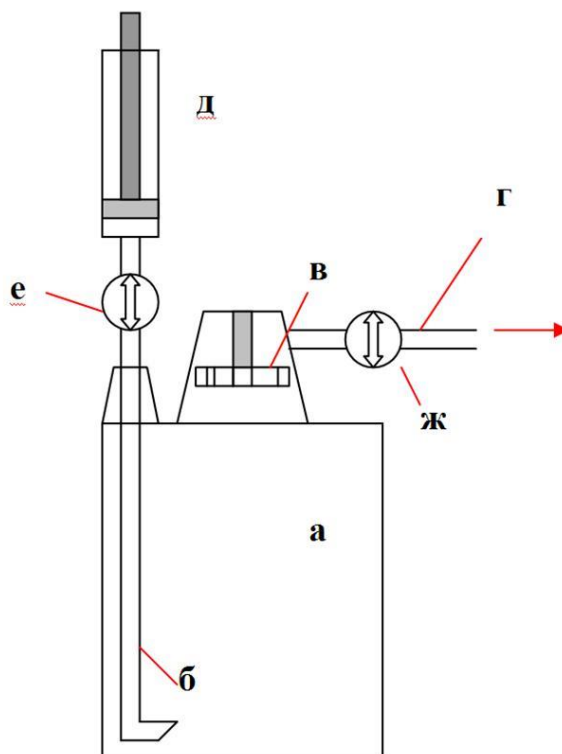


Рисунок 4.8 – Схематическое изображение установки, использованной для нанесения полимерного покрытия из раствора на поверхность объемно-пористых дисперсных частиц. а – сосуд, в который помещали частицы носителя перед вакуумированием; б – трубка для подачи раствора полимера; в – отбойник, препятствующий попаданию частиц носителя в линию насоса; г – линия насоса; д – сосуд с поршнем для подачи раствора полимера; е – вентиль на линии подачи раствора полимера; ж – вентиль для перекрывания насосной линии.

В настоящем исследовании впервые осуществлена ультразвуковая обработка суспензии частиц носителя на стадии пропитки частиц носителя раствором олигомера, поскольку ультразвуковое воздействие, как известно, увеличивает проницаемость молекул в различных системах [373]. Разработанный метод иммобилизации полибутадиенового покрытия на поверхности объемно-пористых дисперсных частиц кремнезема принципиально отличается от способов, описываемых в работах [371, 372]. Как будет показано ниже, предложенный подход также эффективен при получении прекурсоров, используемых при синтезе ФП- и ПАНИ-содержащих сорбентов.

Процесс синтеза полифторбутадиенсодержащих сорбентов и их физико-химические свойства детально описаны в [137]. Здесь же обсуждаются наиболее важные этапы синтеза, отражающие новизну подхода и определяющие придание получаемым композитам требуемых сорбционных свойств. На первой стадии

получения фторполимерсодержащего сорбента на поверхность кремнеземных частиц (МПС) наносили тонкий слой олигобутадиена. Для этого в специально сконструированный вакуумируемый сосуд (Рисунок 4.8) помещали навеску кремнеземного носителя, которую вакуумировали в течение 1 ч при комнатной температуре. В течение первых 10 - 15 мин частицы образовывали «псевдооживленный» слой в результате интенсивного испарения воды, сконденсированной на стенках пор. По мере испарения жидкости частицы полностью оседали на дно сосуда (примерно через 15 мин). Через 1 ч после начала вакуумирования линию насоса перекрывали и подавали в систему раствор олигомера в *n*-пентане таким образом, чтобы раствор проходил со дна сосуда сквозь слой носителя и полностью смачивал его, интенсивно впитываясь при этом в поры частиц. Затем сосуд с полученной суспензией частиц носителя в растворе олигомера обрабатывали ультразвуком при атмосферном давлении в течение 15 мин.

Как известно, в результате прохождения ультразвука в жидкости возникает акустическое давление $P_T = P_h + P_a$, складывающееся из внешнего атмосферного давления (P_h) и акустического давления звуковых колебаний (P_a) [373]. Акустическое давление вызывает колебания молекул растворителя и растворенного вещества относительно их среднего положения и, следовательно, увеличивает мгновенные значения их поступательной энергии. В реальных условиях поступательная энергия за счет упругих столкновений затухает из-за термических и структурных потерь. При этом происходит разогрев системы (в рассматриваемом нами случае регистрировали нагревание суспензии на 3 - 5°C) и облегчается проницаемость растворенных молекул олигомера в поры носителя. При прохождении ультразвука сквозь жидкую среду наблюдается образование пузырьков, что в первом приближении можно объяснить генерацией волны разряжения, способной развить отрицательное давление, достаточное для преодоления межмолекулярных сил сцепления молекул жидкости. В результате при расхождении молекул друг от друга в среде образуются крошечные пустоты (микропузырьки). Различают два типа кавитационных пузырьков. Нестационарные пузырьки образуются при воздействии ультразвука с интенсивностью свыше 10 Вт/см². При схлопывании таких пузырьков вследствие высоких температуры и давления в среде распространяются ударные волны, разрушающие макромолекулы полимеров. Стабильные пузырьки образуются при низких интенсивностях (1-3 Вт/см²) ультразвука. Время существования таких пузырьков достаточно для диффузии газов и теплопередачи. Деструкция макромолекул при ультразвуковой обработке полимерного раствора происходит при

выполнении ряда условий, таких как насыщение раствора плохо растворимыми газами, использование растворителей с низким давлением паров, применение пониженных температур и низких частот излучения, низкие концентрации растворенного полимера и высокая молекулярная масса полимера. В методе, разработанном в настоящем исследовании, перечисленные условия не выполнялись.

Хотя представляется очевидным, что чем выше молекулярная масса макромолекулы, тем быстрее и легче она должна разрушаться под действием ультразвука, в некоторых работах (например, в [374]) было показано, что в определенных условиях макромолекулы под действием ультразвука не разрушаются. Так, в бензольных растворах полистирол с M_n ниже 450 000 не подвергался деструкции при обработке ультразвуком с интенсивностью 5 Вт/см².

В настоящем исследовании при обработке ультразвуком (с частотой 25 кГц) суспензии частиц МПС (40% об.) в растворе олигобутадиена с M_n 4500 (20% масс.) в *n*-пентане ($t_{кип}=36.07^\circ\text{C}$) деструкции молекул олигомера не происходило. Напротив, деструкция весьма вероятна в результате воздействия ультразвука на полимерное покрытие, предварительно стабилизированное межмолекулярными ковалентными связями, что и было продемонстрировано ранее [373].

В качестве альтернативы ультразвуковой обработке для формирования полимерных покрытий, равномерно распределенных по поверхности кремнеземных носителей, в исследовании также оценивали эффективность применения СВЧ-излучения. С этой целью использовали модельные системы, содержащие кремнеземные частицы, на которых синтезировали покрытия из поливинилового спирта [375]. Несмотря на то, что были найдены оптимальные условия проведения синтеза композитов с удовлетворительными характеристиками, метод с использованием СВЧ-обработки (требующий мощной специальной и дорогостоящей СВЧ-установки) уступает в технологичности способу, основанному на применении ультразвукового воздействия малой интенсивности.

После обработки суспензии ультразвуком растворитель отгоняли на роторном испарителе (3 ч, 30 об/мин), получая не смачивающийся водой полупродукт белого цвета. Таким образом, последняя стадия получения прекурсора, представляющего собой частицы кремнезема с иммобилизованным на их поверхности олигобутадиеновым покрытием, заключается в проведении фазоинверсионного процесса. Как известно, в результате фазовой инверсии происходит переход раствора полимера (в котором растворитель является непрерывной фазой) в набухший гель (в котором непрерывной фазой является макромолекулярная сетка полимера). Иными

словами, в полимерном растворе формируются две взаимно диспергированные жидкие фазы, со временем образующие гель, что наблюдается, например, по мере выпаривания растворителя из раствора полимера. Детальное описание процессов, сопровождающих фазовую инверсию и гелеобразование, представлено во многих работах (например, в [127]). В контексте настоящего исследования уместно сделать несколько замечаний, подчеркивающих особенности разработанного метода нанесения тонких полимерных (олигомерных) слоев на поверхность твердых носителей.

К свойствам растворителей, используемых при получении полимерных пленок (покрытий), предъявляют особые требования. Во-первых, растворитель должен отличаться высокой растворяющей способностью, что обеспечит получение гомогенных растворов. В противном случае раствор начнет превращаться в гель при высоком содержании растворителя, в результате чего на поверхности раздела фаз будет формироваться плотная полимерная корка, препятствующая полному удалению растворителя. При этом в образующемся покрытии будут возникать значительные внутренние напряжения, усиливающие его усадку.

Во-вторых, для обеспечения оптимальных условий пленкообразования растворитель должен быть легколетучим. Следует стремиться к тому, чтобы формирующийся градиент вязкости полимерного раствора был незначительным, что позволит эффективно удалять растворитель из образующейся пленки на завершающей стадии процесса.

В-третьих, интенсивное испарение растворителя приводит к заметному охлаждению раствора полимера и паров растворителя в непосредственной близости к поверхности образующейся пленки. Чтобы уменьшить влияние этого нежелательного эффекта в разработанном нами методе растворитель удаляли в два этапа. Сначала материал обрабатывали током воздуха, а после того, как он становился сыпучим, остаточный растворитель удаляли в вакууме до постоянного веса материала. Для предотвращения быстрого и значительного понижения температуры растворитель удаляли, предварительно помещая реактор на водяную баню, разогретую до 70° С [137].

Повышение температуры способствует увеличению прочности получаемых полимерных покрытий. При использовании высококипящих растворителей повышение температуры приводит к ускоренному формированию структуры пленки (покрытия) за счет более быстрого удаления растворителя, что сопровождается ослаблением структурных напряжений в покрытие. Низкокипящие же растворители

при высоких температурах удаляются столь быстро, что макромолекулы не успевают прорелаксировать, что приводит к незначительному повышению прочности образующихся пленок. Используемый в настоящем исследовании прием с удалением растворителя током воздуха замедляет испарение растворителя и, как следствие, препятствует образованию значительных структурных дефектов на первом этапе пленкообразования. Структура полимерного покрытия начинает формироваться, главным образом, на втором этапе испарения, когда концентрация полимера повышается, в среднем, до 20%.

Выпаривание растворителя сопровождается процессами, обратными растворению. По мере увеличения доли удаленных молекул растворителя усиливается образование внутримолекулярных и (в меньшей степени) межмолекулярных связей между макромолекулами. Когда агрегация начинает преобладать над дезорганизацией, начинается гелеобразование. В настоящем исследовании использовали полностью растворенный в низкокипящем растворителе олигомер, поэтому разделения раствора на две взаимно диспергированные фазы не наблюдали вплоть до начала образования геля. При этом даже в процессе гелеобразования растворитель продолжал действовать в качестве пластификатора, что приводило к равномерному уплотнению геля и образованию плотного полимерного покрытия [137].

Таким образом, следует выделить несколько основных отличий разработанного метода иммобилизации олигомерного покрытия на поверхности дисперсных объемно-пористых носителей от ранее предложенных способов. Во-первых, непосредственно перед пропиткой слоя частиц носителя раствором олигомера сосуд, содержащий носитель, вакуумировали. С целью стимулирования капиллярных эффектов и повышения проницаемости пор при их заполнении раствором олигомера проводили ультразвуковую обработку полученной суспензии. И наконец, растворитель удаляли с помощью двухэтапной процедуры.

Как будет продемонстрировано ниже, разработанный подход оказался весьма эффективным при получении прекурсоров, используемых в синтезе фторполимер-, полиарамид- и ПАНИ-содержащих композиционных сорбентов, предназначенных для одностадийного выделения ДНК из биологических смесей, а также для решения других биоаналитических задач.

Существенное отличие разработанного метода получения фторполимермодифицированных кремнеземов от известных ранее способов состоит в проведении химической модификации нанесенной на поверхность кремнеземного

носителя тонкой жидкой олигобутадиеновой пленки с целью ее химического отверждения под воздействием паров дифторида ксенона.

Ранее было показано, что дифторид ксенона можно использовать для эффективного модифицирования поверхности различных полимеров [376]. В результате фторирования полиолефинов с помощью XeF_2 атомы водорода последовательно замещаются атомами фтора. Фторирование желательнее проводить в бескислородных условиях, поскольку в этом случае содержание фтора в образце оказывается в 3 – 6 раз выше по сравнению с образцами, фторированными в воздушной среде.

Можно предположить, что замещение атомов водорода атомами фтора в макромолекулах, имеющих кратные связи (например, в полидиенах), будет осуществляться легче, нежели в полиолефинах, благодаря наличию подвижных аллильных водородных атомов при двойной связи. Также не следует исключать возможность непосредственного присоединения атомов фтора по кратной связи.

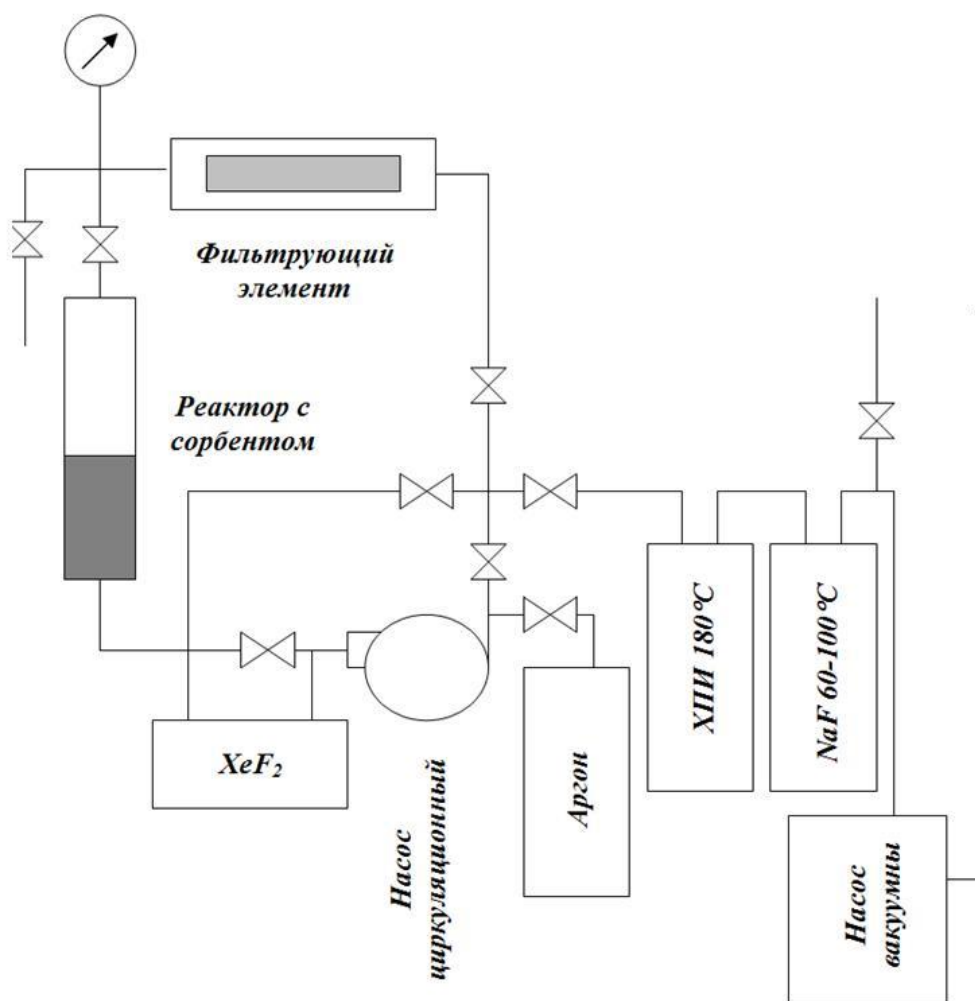


Рисунок 4.9 – Принципиальная схема установки для фторирования дисперсных полимерсодержащих носителей парами дифторида ксенона [137].

В настоящем исследовании показано, что фторирование полидиенов дифторидом ксенона происходит в 1.5 – 2 раза быстрее, чем фторирование полиолефинов. Фторирование проводили на специальной установке (Рисунок 4.9) в атмосфере аргона во избежание появления полярных групп, присутствие которых на поверхности получаемых сорбентов привело бы к заметному росту неспецифической сорбции.

Использование полидиенов в качестве модификаторов поверхности носителей при получении сорбентов обеспечивает важное технологическое преимущество по сравнению с использованием полиолефинов. Полидиены содержат кратные связи, поэтому одновременно с фторированием происходит формирование и структурирование полимерного слоя, в результате чего удается получать прочно иммобилизованные на поверхности носителя сшитые полимерные покрытия с повышенным содержанием фтора. Этот результат достигается благодаря параллельно протекающим реакциям: рекомбинации макрорадикалов в результате отрыва атомов водорода с образованием межмолекулярных связей, а также вследствие присоединения радикалов по кратным связям. Как оказалось, в результате изменения температуры и продолжительности процесса, можно в широком диапазоне контролировать степень фторирования, что было подтверждено данными элементного анализа. Показано, что доля связанного фтора в составе покрытия (в пересчете на массу полимерной фазы) повышается с 25 % масс. в результате обработки олигобутадиенсодержащего прекурсора парами XeF_2 в течение 1.5 ч до 53% масс. при 3-часовой обработке. Основные реакции, протекающие в процессе фторирования полибутадиенов (на примере 1,4-звена), схематически представлены на Рисунке 4.10.



Рисунок 4.10 – Химические реакции, протекающие при взаимодействии дифторида ксенона с макромолекулами олигобутадиена. Схема взята из [137].

Скорость фторирования лимитируется, в основном, диффузией молекул фторирующего агента в олигомерный слой. Оптимальную продолжительность обработки дифторидом ксенона определяли, оценивая долю химически связанного фтора в составе получаемого полимерного покрытия, и принимая во внимание необходимость в предотвращении деструкции поверхности неорганического носителя. Содержание фтора в образцах сорбентов, полученных в результате обработки дифторидом ксенона, осуществляемой с различной продолжительностью, оценивали с помощью элементного анализа.

Также было показано, что оптимальная степень фторирования достигается при обработке в течение 3 ч при комнатной температуре. На это указывает не только незначительное отличие по содержанию фтора в образцах, полученных при трех- и четырехчасовой обработке. Важно, что в последнем случае было отмечено увеличение диаметра пор полученного материала до значения, превосходящего диаметр пор исходного носителя, что указывало на начало деструкции поверхности кремнезема.

Как оказалось, значения рН водных суспензий полученных сорбентов при выдерживании при комнатной температуре в течение нескольких часов понижаются. По-видимому, это вызвано накоплением на поверхности получаемых материалов сконденсированных растворимых веществ, в том числе, кислот Брэнстеда. Действительно, спектрометрический анализ экстрактов, полученных в результате выдерживания образцов сорбентов в метаноле в течение 24 ч, показал наличие интенсивного поглощения при $\lambda = 230$ нм. Поэтому перед использованием сорбентов сконденсированный на поверхности пор дифторид ксенона, а также побочные продукты фторирования (прежде всего, фтористоводородную кислоту и гексафторкремниевую кислоту, образующуюся при взаимодействии HF с кремнеземом) удаляли в вакууме при повышенной температуре. Оптимальный режим обработки с целью удаления указанных соединений с поверхности полученных сорбентов предусматривает вакуумирование при 75°C в течение 4 ч. Очевидно, что эти параметры могут меняться в зависимости от удельной площади поверхности образца и доли полимерной фазы в составе сорбента.

Промывка метанолом в экстракторе Сокслета (4 ч, 20 циклов) обеспечивала отсутствие поглощения в надосадочной жидкости в УФ- и в видимой областях спектра.

Пористость полученных материалов, оценку толщины и сплошности полимерного фторсодержащего покрытия исследовали методами ртутной

порометрии, элементного анализа и с помощью тестов на гидролитическую стабильность, соответственно. Полученные данные приведены в Таблице 4.5.

Таким образом, был разработан эффективный метод синтеза фторполимерсодержащих композиционных сорбентов с использованием неактивированных кремнеземных носителей. В качестве примера можно привести оптимальные условия синтеза полифторбутадиенсодержащего сорбента на основе МПС со средним диаметром пор 52 нм и с удельной площадью поверхности 88 м²/г. Для эффективного фторирования дифторидом ксенона слоя олигобутадиена (средняя M_n 4500, содержание 1,4-цис- и 1,4-транс-звеньев – 80%, 1,2-звеньев - 20%), предварительно нанесенного на поверхность МПС методом кастинга, необходима инертная атмосфера (аргон), продолжительность фторирования не должна превышать 3 ч (при 20°C), продолжительность последующего вакуумирования (0.05 мм рт. ст.) не должна быть менее 4 ч (при 75°C). Расход XeF₂ составил 0.91 г на 1 г сорбента.

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)

В литературном обзоре (подраздел 1.7.3) рассмотрены работы, посвященные исследованию матричного синтеза ПАНИ в присутствии различных растворимых полимерных (или олигомерных) кислот. Благодаря наличию в системе молекул

поликислоты, обеспечивающей протонирование анилина, происходит локализация молекул мономера вдоль молекулы поликислоты, и дальнейшая полимеризация при добавлении окислителя протекает вдоль цепи макромолекулы-матрицы с образованием поликомплекса поликислота-ПАНИ. В результате система остается фазово-однородной на всех этапах полимеризации (в отличие от способов, в которых используют низкомолекулярный допант), а в реакционном объеме не образуются нерастворимые частицы полимера.

Основной целью данного исследования являлась разработка технологичных методов синтеза полимерсодержащих сорбентов, демонстрирующих эффект негативной селекции в отношении НК и пригодных для одностадийного выделения НК из сложных биологических смесей. Поскольку одна из задач исследования состоит в получении серии новых ПАНИ-содержащих сорбентов, были изучены некоторые особенности полимеризации анилина в присутствии нерастворимых твердых полисульфоокислот, одновременно являющихся носителями при синтезе ПАНИ-содержащего материала. В качестве таких носителей были использованы два типа материалов: промышленно выпускаемый катионит Dowex с известной концентрацией поверхностных сульфогрупп и серия разработанных нами носителей на основе кремнезема (Si-500, НИИ «Химтех», Армения), покрытого нанослоями сульфированного сополимера стирола с дивинилбензолом с различной степенью сульфирования (Рисунок 4.11).

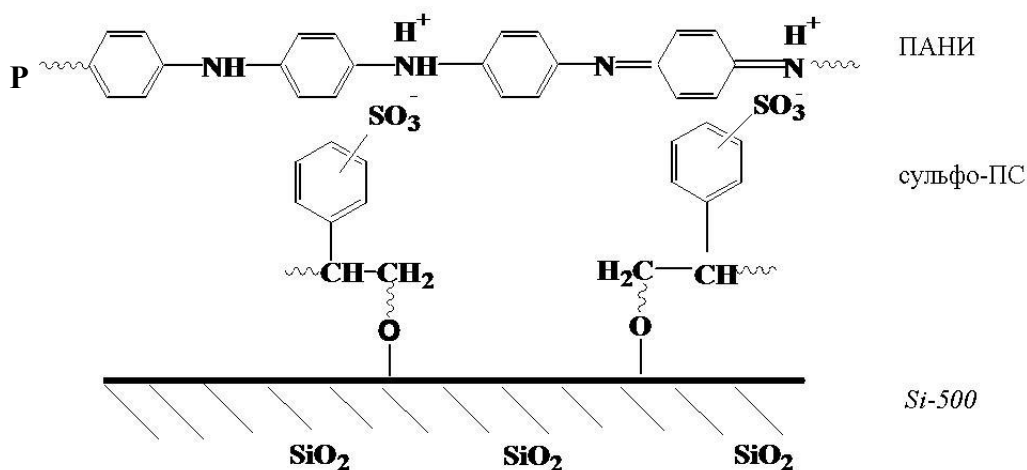


Рисунок 4.11 – Схематическое представление структуры полимерного нанослоя в образцах полученных ПС-ДВБ-ПАНИ-содержащих сорбентов [360].

В начале Главы 4 (Рисунок 4.2) представлены кинетические кривые полимеризации анилина в отсутствие носителя, построенные с использованием

гравиметрического (по приросту массы полимера) и спектрофотометрического (по убыли мономера) методов. Поскольку эти кривые практически идентичны, построение кинетических кривых по убыли мономера (технически более простой способ) при исследовании полимеризации анилина в присутствии носителей оправдано.

Образцы полимерной смолы Dowex содержат известное количество сульфогрупп. Поверхность таких материалов относительно невелика для их эффективного использования в биосепарации картриджным методом (также следует принять во внимание их набухаемость в водно-органических смесях). Поэтому использование катионообменных смол Dowex для оценки влияния концентрации поверхностных сульфогрупп на полимеризацию анилина нецелесообразно.

В настоящем исследовании в качестве более подходящей модели для оценки влияния поверхностной концентрации сульфогрупп носителя на полимеризацию анилина получали кремнеземы, поверхностно модифицированные полимерами с различным содержанием сульфогрупп. С этой целью на первом этапе поверхность кремнезема покрывали политетрафторэтиленом методом γ -инициированной радиационной полимеризации, затем на полученное покрытие методом радиационной *post*-сополимеризации прививали сополимер стирола с дивинилбензолом, получая материал, содержащий (по данным ртутной порометрии) полимерное покрытие толщиной ~ 5 нм. Полученный полистиролсодержащий носитель сульфировали, обрабатывая раствором серной кислоты, варьируя продолжительность обработки. В результате получали серию носителей с различным содержанием поверхностных сульфогрупп. Зависимость концентрации образующихся сульфогрупп (определяемой титрованием) от времени сульфирования представлена на Рисунке 4.12. Максимальная концентрация сульфогрупп была достигнута в результате сульфирования в течение 1.5 ч и составила 0.109 ммоль/г носителя. Уменьшение концентрации сульфогрупп при более длительном сульфировании, по-видимому, является следствием начала разрушения и растворения привитого полимерного покрытия.

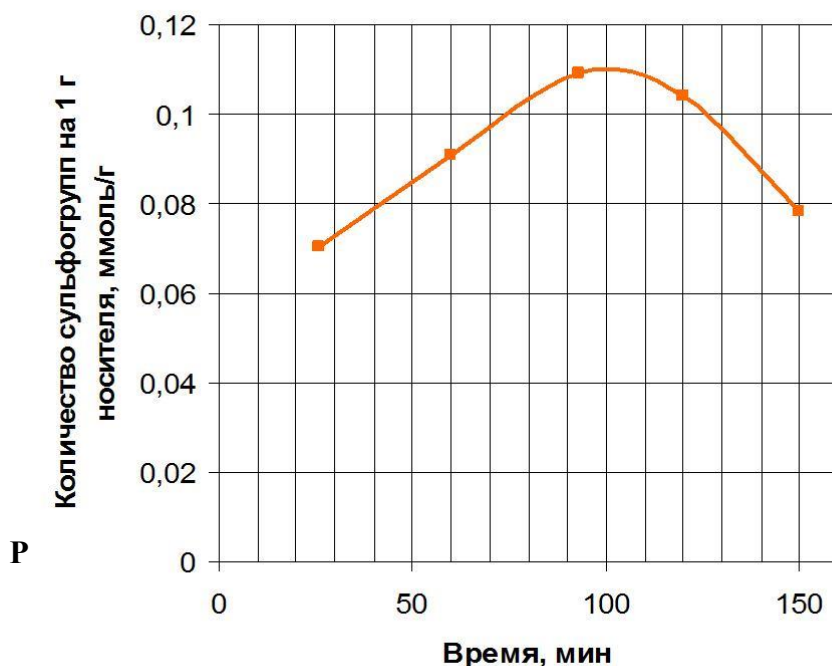


Рисунок 4.12 - Зависимость количества сульфогрупп на поверхности Si-500-ПС от продолжительности сульфирования.

Проведенные эксперименты показали, что как в результате полимеризации анилина в присутствии полученных сульфированных носителей, так и в присутствии катионообменника Dowex реакция протекает в отсутствие низкомолекулярного допанта – хлористоводородной кислоты. Индукционный период полимеризации во всех случаях не превышал 1 мин. На поверхности носителей формировалось устойчивое ПАНИ-покрытие.

Следует отметить, что в процессе модифицирования образцов наблюдали различные цветовые эффекты. Вначале было отмечено, что цвет реакционной смеси (суспензии), содержащей носители с низким содержанием сульфогрупп, оставался коричневым в течение всего времени проведения реакции, что указывало на образование ПАНИ в форме лейкоэмеральдина, а также на формирование разветвленных дефектных макромолекул ПАНИ [377]. Поэтому в последующих экспериментах с целью проведения синтеза ПАНИ-покрытий в условиях, приближенных к условиям полимеризации анилина в отсутствие носителя, реакцию проводили, добавляя соляную кислоту, взятую в недостатке, при соотношении мономер:допант:окислитель, равном 1:0.9:1.

Необходимо отметить, что при полимеризации анилина с использованием аналогичного соотношения реагентов как в отсутствие носителя, так и в присутствии немодифицированного кремнезема, реакционная смесь в ходе процесса была окрашена в коричневый цвет, что, по-видимому, также свидетельствует об образовании разветвленных форм ПАНИ. Напротив, при полимеризации анилина в присутствии сульфированных кремнезёмов для всех исследованных образцов было отмечено характерное синее окрашивание реакционной системы, что указывает на образование эмеральдиновой соли ПАНИ. При этом так же, как и в случае полимеризации в отсутствие соляной кислоты, образование частиц ПАНИ в объеме реакционной системы не наблюдали. Наибольший выход полимера был достигнут при полимеризации анилина в присутствии носителя с максимальной концентрацией сульфогрупп на поверхности (0.109 ммоль/г).

В результате исследования полученных композиционных сорбентов методом ртутной порометрии было показано, что толщина сформированного ПАНИ-покрытия составляет около 3 нм, а синтезированный материал сохраняет пористость. Характеристики полученного материала представлены в сводной таблице 4.5. Таким образом, был разработан новый способ получения композиционных ПАНИ-содержащих сорбентов.

Высокая стабильность синтезированного материала подтверждена тестами на гидролитическую стабильность в условиях щелочного гидролиза, что (как и в случае описанного в предыдущем подразделе ПФБД-содержащего материала) указывало на наличие сплошного равномерно распределенного полимерного покрытия, эффективно экранирующего поверхность кремнеземного носителя.

Как будет показано ниже, полученные сорбенты продемонстрировали наибольшую эффективность при выделении ДНК из лизатов растительных тканей (содержащих хлорофиллы и продукты их деградации в результате лизиса), что обусловлено (помимо наличия ПАНИ-покрытия) присутствием остаточных поверхностных сульфогрупп. Однако сложности при масштабировании технологии получения этих материалов (связанные прежде всего с необходимостью проведения γ -инициированной радиационной полимеризации) привели к поиску альтернативных способов получения ПАНИ-содержащих композитов, пригодных для эффективного одностадийного выделения НК из биологических смесей.

4.1.2.2. Получение ПАНИ-содержащих кремнеземных сорбентов в результате матричной полимеризации анилина в присутствии иммобилизованных полисульфокислот (ПСК)

В предыдущем подразделе диссертации обсуждался разработанный нами способ получения ПАНИ-содержащих кремнеземных сорбентов, в основу которого положена методология, обеспечивающая протекание полимеризации анилина непосредственно на поверхности носителя, в результате чего формировалось тонкое сплошное полимерное покрытие, а в реакционном объеме не образовывались полимерные частицы, загрязняющие продукт (сорбент). Иными словами, полученное на поверхности сорбента полимерное покрытие представляло собой поликомплекс ПАНИ и иммобилизованного на поверхности носителя сульфированного полистирола, т. е. самодопированное производное ПАНИ - полимерсодержащая структура, содержащая кроме полианилиновых звеньев свободные поверхностные сульфогруппы [360].

В идеале подбор оптимальных условий синтеза подобных структур должен обеспечить получение растворимых анилинсодержащих полимерных модификаторов, которые могут быть иммобилизованы на поверхности носителя. Одновременно такой подход предполагает возможность получения покрытий с заданным химическим составом и требуемыми морфологическими характеристиками. Для решения этой комплексной задачи подходят растворимые полисульфокислоты (ПСК), которые можно использовать в качестве макромолекулярных допантов при матричной полимеризации анилина [378] и в то же время в качестве компонента получаемого ПАНИ-содержащего полимерного модификатора.

В отличие от осадительной полимеризации анилина в присутствии низкомолекулярной кислоты, в процессе матричной полимеризации система остается фазово-гомогенной [379]. В других работах (например, в [380]) было продемонстрировано, что при синтезе ПАНИ в присутствии ароматической поликислоты поли-(n, n' -(2,2'-дисульфоновой кислоты)дифениленизофталамида (изо-ПСК) локальная концентрация протонированного анилина в окрестности макромолекулы ПСК растет по сравнению с концентрацией в растворе. Следствием этого является повышение скорости полимеризации анилина по сравнению с синтезом ПАНИ в присутствии низкомолекулярных кислот, а сам процесс локализуется в области макромолекулы-матрицы (т. е. ПСК).

Использование ПСК в качестве компонента анилинсодержащих полимерных модификаторов, пригодных для синтеза ПАНИ-содержащих кремнеземных композитов, обеспечивает возможность реализации, по крайней мере, двух способов получения таких материалов (Рисунок 4.13). Во-первых, полимеризацию анилина можно проводить в присутствии носителя, предварительно модифицированного нанослоем ПСК. Для этого поверхность носителя должна быть определенным образом активирована, т. е. сначала на поверхности кремнезема необходимо создать функциональные группы, способные образовывать устойчивые связи с сульфогруппами ПСК. При этом важно учитывать, что в молекулах ПСК после иммобилизации должно сохраняться достаточное количество доступных сульфогрупп, способных участвовать в протонировании анилина. Во-вторых, в качестве полимерного модификатора можно использовать предварительно полученные поликомплексы ПСК-ПАНИ, иммобилизуемые на активированную поверхность кремнеземного носителя. В последнем случае масштабирование технологии получения ПАНИ-содержащих кремнеземных композитов упростится за счет сокращения числа стадий синтеза.

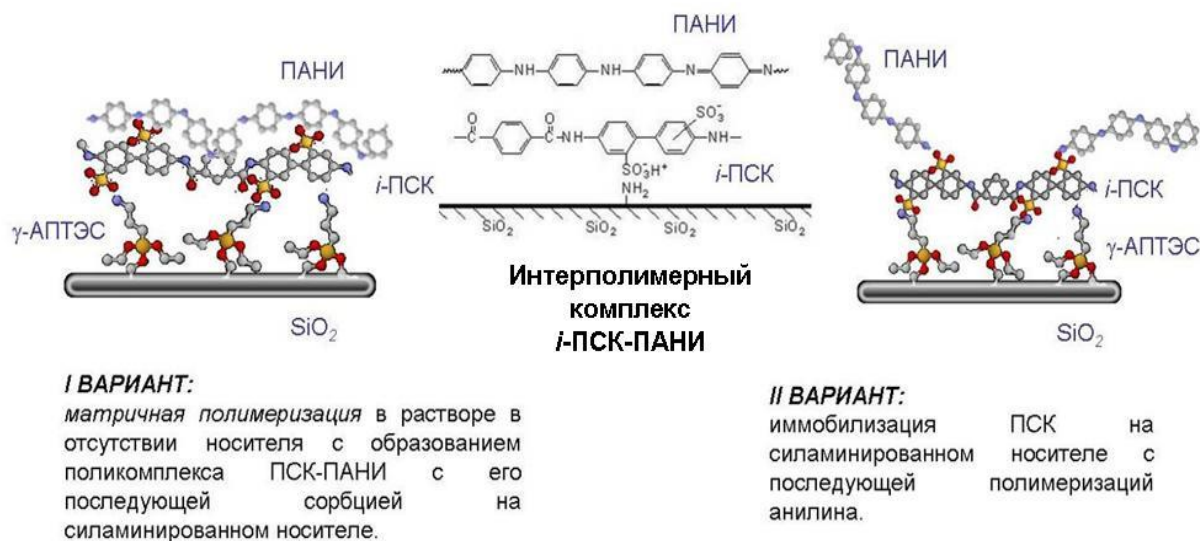


Рисунок 4.13 - Матричный синтез ПАНИ в присутствии ПСК на поверхности предварительно силанированных кремнезёмов.

Использование матричной полимеризации с получением поликомплексов ПСК-ПАНИ позволит решить несколько практически значимых проблем. Прежде всего, следует ожидать, что полимеризация анилина в присутствии ПСК будет протекать без образования взвеси частиц ПАНИ в реакционном объеме, что существенно упростит процедуру отмывки конечного продукта при сохранении его качества. Это относится

как к полимеризации анилина в растворе ПСК, так и в присутствии ПСК-модифицированного кремнезема. Использование в качестве модификаторов предварительно полученных устойчивых поликомплексов ПСК-ПАНИ упростит технологию получения ПАНИ-содержащих композитов по сравнению с ранее описанными нами способами. Наконец, проведение полимеризации анилина в присутствии ПСК в контролируемых условиях позволит придать поверхности получаемого сорбента дополнительную функциональность за счет наличия некоторого количества свободных остаточных сульфогрупп в иммобилизованном поликомплексе. В конечном счете, это означает возможность получать сорбенты с заранее предсказанным сорбционным поведением.

Сделанные предположения были подтверждены экспериментально. Матричный синтез ПАНИ проводили в присутствии *изо*- и *тере*-ПСК. Состав полученных комплексов подтверждали методом ИК-спектроскопии (см. описание экспериментов в Главе 2). На всех полученных спектрах (кроме спектра ПАНИ) присутствовали пики, соответствующие группам $-\text{SO}_3\text{H}$ (1000 см^{-1}) и $>\text{C}=\text{O}$ ($1850\text{--}1650\text{ см}^{-1}$). Также были отмечены пики, соответствующие связям $-\text{Ph}-\text{NH}-$ ($=\text{CH}-\text{NH}-$, в области около 1150 см^{-1}). При исследовании поликомплексов *изо*-ПСК-ПАНИ интенсивность пика, определяемого присутствием связи $-\text{Ph}-\text{NH}-$, возрастала с увеличением содержания анилиновых звеньев в комплексе.

В качестве носителя для приготовления ПАНИ-содержащих композитов использовали объемно-пористый кремнезем Si-500 (ОАО «Химтех», Армения). Поверхность кремнезема предварительно активировали, обрабатывая 3-аминопропилтриэтоксисиланом (как описано, например, в [211]). Были осуществлены два варианта модификации носителя: полимеризация анилина в присутствии силаминированного кремнезема, предварительно обработанного раствором ПСК, и модификация силаминированного кремнезема готовыми комплексами ПСК-ПАНИ.

Данные спектрофотометрии подтвердили, что присутствие аминогрупп на поверхности кремнезема обеспечивает эффективную сорбцию макромолекул ПСК. На Рисунке 4.14 представлены кинетические кривые сорбции *изо*- и *тере*-ПСК из разбавленных водных растворов на поверхности силаминированного кремнезема. Насыщение поверхности носителя слоем ПСК происходило при комнатной температуре примерно с 40 минуты. Полученные покрытия не разрушались как в метаноле, так и в водном растворе соляной кислоты. Степень сорбции *изо*-ПСК оказалась выше, чем *тере*-ПСК.

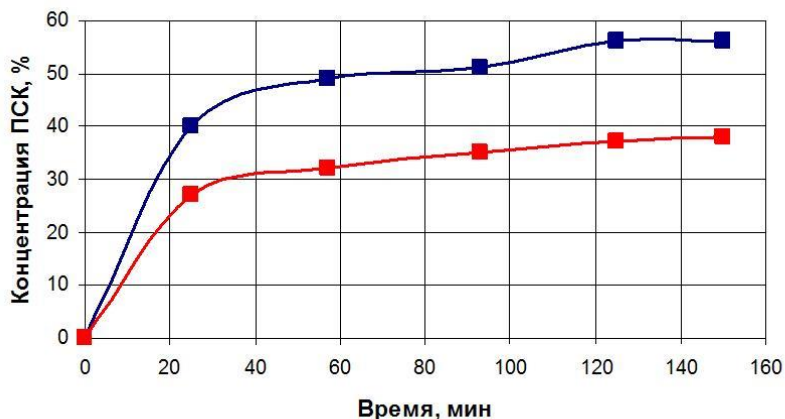


Рисунок 4.14 - Кинетика сорбции полисульфоокислот *изо*-ПСК (1) *тере*-ПСК (2) на поверхности силаминированного кремнезема с концентрацией аминогрупп 0.32 ммоль/г. За 100% принимали начальную концентрацию ПСК в водном растворе (7.3 мг/мл).

Проведенная аналогичным образом оценка степени сорбции предварительно полученных поликомплексов *изо*- и *тере*-ПСК с ПАНИ на силаминированном кремнеземе показала, что в отличие от комплекса *изо*-ПСК-ПАНИ комплекс *тере*-ПСК-ПАНИ не удерживался силаминированной поверхностью. Это объясняется, по-видимому, различиями в структурах полученных интерполимерных комплексов, что приводит к появлению структурно-чувствительных эффектов при сорбции комплексов. Известно, что при участии *изо*-ПСК формируется двухцепочечный поликомплекс, а в случае *тере*-ПСК поликомплекс характеризуется гребнеобразной структурой [380]. При этом ПАНИ, синтезированный на *тере*-ПСК, взаимодействует с максимально возможным числом свободных сульфогрупп макромолекулы-матрицы. При полимеризации анилина в присутствии *изо*-ПСК структура поликомплекса стабилизируется в результате взаимодействия образующегося ПАНИ лишь с доступными для него сульфогруппами. Поэтому определенная доля свободных сульфогрупп сохраняется, обеспечивая дальнейшее взаимодействие поликомплекса с силаминированной поверхностью носителя.

Как оказалось, в результате модифицирования силаминированного кремнезема комплексами *изо*-ПСК-ПАНИ с различной степенью замещения H^+ на Na^+ сорбция поликомплексов возрастала пропорционально увеличению содержания протонированных сульфогрупп (Рисунок 4.15). Исследовали образцы поликомплексов, содержащих примерно 90%, 60% и 30% протонированных сульфогрупп, соответственно [360].

Полученные покрытия (как и в случае сорбции индивидуальных ПСК) оставались стабильными при выдерживании в среде метанола или в водном растворе соляной кислоты.

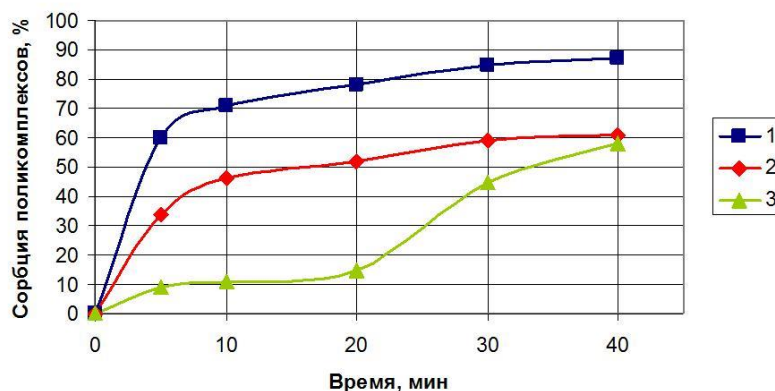


Рисунок 4.15 - Кинетика сорбции поликомплексов *изо*-ПСК-ПАНИ (полученных при соотношении мономер:окислитель, равном 1:1) с различным содержанием протонированных сульфогрупп: 1 – 86 г-экв %; 2 – 60 г-экв %; 3 – 25 г-экв %.

Полимеризацию анилина в присутствии кремнеземов, модифицированных *изо*- и *тере*-ПСК, проводили при соотношении мономер-окислитель 1:1. В случае *изо*-ПСК конверсия мономера достигала почти 70%; в случае *тере*-ПСК это значение не превышало 60% (Рисунок 4.16).

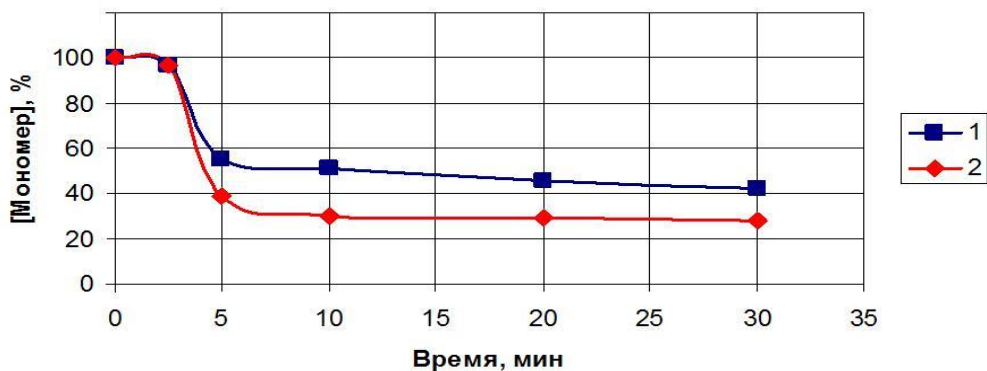


Рисунок 4.16 - Убыль мономера при полимеризации анилина в присутствии Si-500-NH₂-*тере*-ПСК (1) и в присутствии Si-500-NH₂-*изо*-ПСК (2) при соотношении мономер:окислитель, равном 1:1. Начальная концентрация анилина составляла 0.42 ммоль/г носителя.

Обоснованность выбора растворимых ПСК в качестве сомодификаторов при синтезе ПАНИ-содержащих сорбентов была подтверждена данными, полученными

при исследовании кинетики формирования полимерных частиц в объеме реакционной смеси и их распределения по размерам. Эти данные были получены методом лазерной корреляционной спектроскопии в режиме реального времени (с использованием субмикронного анализатора частиц, Coulter N4MD, Франция). Полимеризацию анилина проводили в присутствии немодифицированного кремнезема Si-500 при мольном соотношении мономер:допант:окислитель, равном 1:3:1 (в качестве допанта использовали соляную кислоту, в качестве окислителя - персульфат аммония), а также в присутствии кремнезема Si-500, модифицированного *изо*-ПСК, при мольном соотношении мономер:окислитель, равном 1:1. В первом случае через 20 мин после начала полимеризации регистрировали образование в реакционном объеме крупных частиц диаметром до 3000 нм (Рисунок 4.17, 2). При использовании в качестве носителя кремнезема, модифицированного поликомплексом *изо*-ПСК-ПАНИ, были обнаружены только мелкие частицы диаметром около 3 нм (Рисунок 4.17, 4). При своевременном удалении надосадочной жидкости, содержащей эти частицы, качество получаемого сорбента не ухудшается.

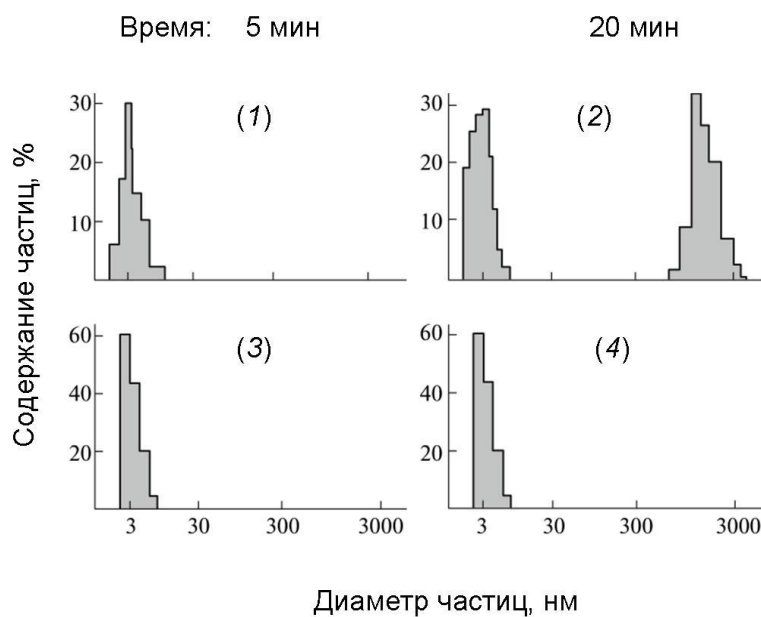


Рисунок 4.17 - Гистограммы распределения образующихся частиц ПАНИ по размерам при полимеризации анилина в присутствии немодифицированного кремнезема (1, 2) и в присутствии кремнезема, модифицированного поликомплексом *изо*-ПСК-ПАНИ (3, 4). Гистограммы построены в полулогарифмических координатах.

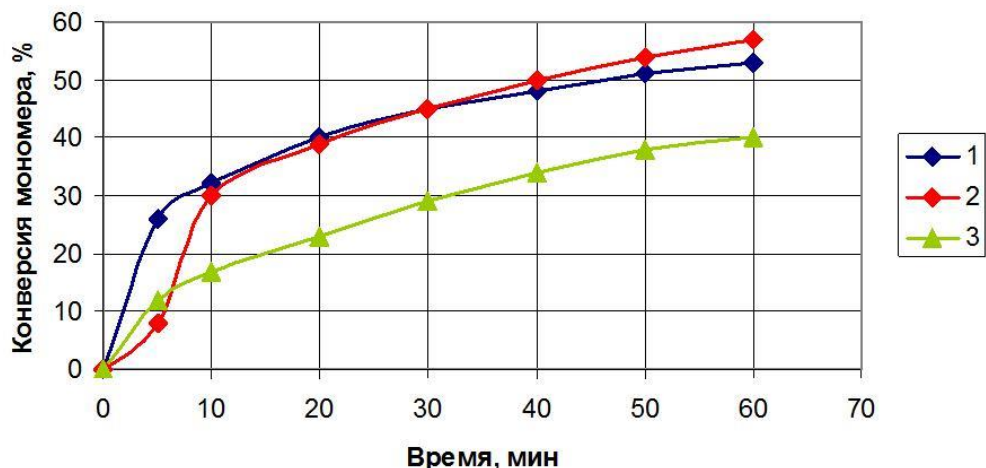


Рисунок 4.18 - Кинетические кривые образования поликомплексов *изо*-ПСК-ПАНИ при различных мольных соотношениях мономер:ПСК: 1 – 2:1, 2 – 1:1, 3 – 1:2. Концентрация сульфогрупп – 16.8 ммоль/л.

Для ответа на вопрос, оказывает ли влияние на кинетику образования полимерного комплекса соотношение анилин:ПСК, исследовали кинетику полимеризации анилина в присутствии ПСК, изменяя количество взятого в реакцию анилина. На Рисунке 4.18 приведены кинетические кривые образования поликомплексов *изо*-ПСК-ПАНИ при различных мольных соотношениях анилин:ПСК. Анализ полученных кривых позволил установить, что оптимальным является соотношение 1:1, поскольку в этом случае достигается максимальная конверсия мономера (около 60%), а кинетическая кривая имеет S-образную форму, наиболее приближенную к форме кривой, получаемой при полимеризации анилина в отсутствие носителя при оптимальном соотношении мономер:допанти:окислитель, равном 1:3:1. Полученные полимерные комплексы осаждали органическими растворителями (в частности, ацетоном, диоксаном и метанолом). При этом доля высаженного комплекса уменьшалась в ряду диоксан > ацетон >> метанол. Высушенные после высаживания препараты поликомплексов практически нерастворимы в органических растворителях (за исключением тетрагидрофурана и диметилформамида), однако хорошо растворяются в воде, что снимает ряд технологических сложностей при использовании полученных образцов полимерных комплексов в качестве модификаторов поверхности химически активированных кремнеземных носителей. Высушенные препараты поликомплексов оказались стабильны при длительном хранении при комнатной температуре (по крайней мере, до 3 лет) и могут быть использованы 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.

Таким образом, разработанная технология получения ПАНИ-содержащих кремнеземных сорбентов, основанная на использовании предварительно полученных интерполимерных комплексов *изо*-ПСК-ПАНИ в качестве полимерных модификаторов, является простой и эффективной альтернативой способам получения ПТФЭ-содержащих композитов, основанным на применении источника γ -излучения.

4.1.2.3. Синтез кремнеземных сорбентов, модифицированных сополимерами анилина с замещенными анилинами

В данном относительно кратком подразделе диссертации рассматриваются способы придания дополнительной функциональности ПАНИ-покрытию, формируемому на поверхности твердого носителя. Основные методологические приемы, используемые для решения этой задачи, были отработаны при получении сорбентов методом кастинга и при проведении полимеризации анилина в присутствии твердых носителей. Эти приемы описаны выше.

Можно предположить, что придание поверхностному полимерному слою сорбента дополнительной функциональности за счет введения в состав полимерного модификатора различных функциональных групп (например, карбоксильной, нитрогруппы, метильной группы) позволит расширить область применения получаемых сорбентов. Следует ожидать, что введение заранее определенного количества замещенных анилиновых звеньев в структуру ПАНИ приведет к контролируемым изменениям растворимости полимерного модификатора, гидрофильно-липофильных свойств поверхности получаемого сорбента, что также будет способствовать эффективной иммобилизации полимерного нанопокрывтия на предварительно активированной поверхности носителя. Поскольку химическая модификация сформированного на твердой подложке 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.

При использовании 3-АБК раствор окислителя смешивали с раствором смеси мономеров, взятых в различных мольных соотношениях. Окислительную

сополимеризацию проводили при 55°C в течение 20 мин. Выход продукта составил 40-60%. Таким способом были получены анилинсодержащие полимерные модификаторы с соотношением анилин: 3-АБК = 1:1 и 3:1.

Стойкое покрытие на основе сополимеров анилина с 3-АБК удалось получить в случае преобладания в сополимере доли звеньев анилина (поскольку при содержании остатков 3-АБК свыше 50% сополимеры растворялись в воде при щелочных рН). Для получения стабильного в водных средах сорбента, содержащего поверхностные карбоксильные группы, проводили хемосорбцию активированного карбодиимидом сополимера анилина с 3-АБК на поверхности силанированного кремнезема.

Альтернативный подход состоял в модифицировании поверхности кремнеземного носителя готовыми сополимерами анилина с 3-АБК методом кастинга из их растворов в ТГФ. Предварительно вакуумированный в специальном реакторе образец кремнеземного носителя пропитывали раствором полимерного модификатора. С целью обеспечения равномерного распределения макромолекул по поверхности пор носителя систему подвергали ультразвуковой обработке. Растворитель выпаривали. Полученный продукт промывали ТГФ, метанолом, водой, а затем сушили в вакууме.

Аналогичным способом получали сополимеры анилина с *m*-нитроанилином или *o*-толуидином. Степень включения в состав синтезируемых ПАНИ-содержащих макромолекул остатков замещенных анилинов определяли элементным анализом и подтверждали методом ИК-спектроскопии. Элементный анализ (на основании определения содержания атомов С, N и H и расчета содержания атомов O) показал, что дополнительно вводимые звенья включались в состав макромолекулы анилинсодержащего сополимера в долях, соответствующих взятым в реакцию соотношениям мономеров (Таблица 3.1).

Из приведенных в Таблице 4.1 данных следует, что полученные сополимеры обогащены звеньями 3-АБК, а также нитроанилиновыми звеньями. Последний факт был подтвержден экспериментально тестом на растворимость полученных полимерных модификаторов. Синтезированные сополимеры оказались растворимы в ТГФ, однако сополимер анилина с 3-АБК оказался растворим в водной среде при $\text{pH} \geq 9.0$. В то же время сополимер 3-АБК-ПАНИ (равно как и гомополимер анилина), полученный при мольном соотношении сомономеров, равным 1:1, оказался нерастворим в воде и в водно-органических смесях.

Таблица 4.1 - Сравнение теоретического и определенного методом элементного анализа содержания элементов в гомополимере ПАНИ и в полученных сополимерах анилина с замещенными анилинами (представленные значения округлены до целых величин).

Полимерный модификатор	Теоретически рассчитано				Определено элементным анализом			
	С	Н	N	O	С	Н	N	O
ПАНИ	79	6	15	0	81	5	14	0
3-АБК-ПАНИ (3:1)	74	4	14	8	59	4	11	26
3-АБК-ПАНИ (1:1)	69	5	12	14	60	3	10	28
ПАНИ- <i>n</i> -нитроанилин (1:1)	63	5	18	14	64	3	13	20
ПАНИ- <i>o</i> -толуидин (1:1)	80	6	14	0	79	6	15	0

С целью получения ИК-спектров пленок ПАНИ, сополимеров анилина с 3-АБК (в молярном соотношении 3:1 и 1:1), а также гомополимера 3-АБК, указанные полимеры растворяли в ТГФ и осаждали на пластинах КВг в результате испарения растворителя. Максимум поглощения при $\lambda = 1750 \text{ см}^{-1}$ (карбоксыльная группа) увеличивался пропорционально увеличению содержания 3-АБК звеньев.

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, были разработаны покрытия с уникальными свойствами для масс-спектрометрического анализа пептидов (Глава 5).

4.1.2.4. Озон-индуцированная полимеризация на поверхности твердых носителей

При разработке методов прямого синтеза полимерсодержащих сорбентов на основе кремнеземов предполагалось, что будут найдены способы активации поверхности носителя, позволяющие локализовать процесс полимеризации в приповерхностном слое носителя. Как правило, методы химической активации специфичны для каждой конкретной реакции. Поскольку при получении покрытий фторполимеров и ПАНИ (демонстрирующих эффект «*негативной селекции*» в отношении НК) используют мономеры, полимеризующиеся по различным механизмам, «активированная» поверхность должна быть одновременно пригодна для проведения различных типов реакций. Использование «универсального»

активирующего агента в этом случае позволило бы снизить технологические издержки при масштабировании синтеза сорбентов.

Подходящим активатором поверхности кремнеземных носителей является озон. Известно, что при обработке озоном различных органических полимерных материалов образуются соответствующие пероксидные группы и/или озониды [381], которые, в принципе, могут служить центрами инициирования полимеризации добавляемых в систему мономеров. При использовании неорганических полимеров, каковым является кремнезем, ситуация иная, поскольку сам по себе диоксид кремния не вступает в химическую реакцию с озоном. Однако в составе кремнезёмов, как правило, содержатся различные примеси, в частности, оксиды железа или алюминия (в среднем, 0.5 - 3.5% в зависимости от условий получения кремнезёма). В определенных условиях упомянутые соединения под действием озона образуют ионные или ион-радикальные химические структуры, способные в силу своей природы инициировать полимеризацию различных мономеров. К моменту начала проведения настоящего исследования в научной литературе не были обнаружены работы, посвященные детальному изучению таких процессов. Первый шаг, предпринятый в настоящем исследовании, заключался в оценке возможности и эффективности использования активированного озоном кремнезёма в качестве гетерогенного инициатора полимеризации мономеров, различающихся химическим строением и полимеризующихся по различным механизмам.



Рисунок 4.19 – Установка для обработки сыпучих носителей озонowo-воздушной смесью, генерируемой озонатором ОГВК-20К.

С целью активации озоном поверхности частиц кремнеземных носителей образцы помещали в стеклянный реактор, соединенный с озонатором (ОГВК-20К, ЗАО МЭЛП, Россия), генерирующим ток озонowo-воздушной смеси при заданном

расходе и известном содержании озона (Рисунок 4.19). Благодаря использованию указанного устройства была обеспечена возможность получения озона из воздуха, что принципиально упростило и сделало более безопасной технологию получения полимерсодержащих кремнеземных сорбентов, поскольку отпала необходимость в использовании сжиженного кислорода.

С целью удаления не прореагировавшего озона и газообразных продуктов реакции обработанные озоном образцы вакуумировали. По результатам последующего йодометрического титрования было установлено, что обработка поверхности кремнеземных частиц озоном приводит к образованию поверхностных пероксидных структур, а количество определяемых титрованием пероксидных групп зависит от содержания в кремнеземном носителе металлсодержащих примесей.

Количество образующихся поверхностных пероксидных групп оценивали по интенсивности поглощения супернатантов непосредственно после титрования. В результате сопоставления полученных данных с продолжительностью озонирования носителя и расходом озона было установлено, что оптимальная продолжительность озонирования не должна превышать 4 ч при расходе смеси озон-воздух 5 л/ч (Таблица 4.2). Этот вывод был сделан при использовании образца кремнезема, содержащего около 3.5% оксидов алюминия (Si-500, ЗАО Химтех, Армения) на основе данных о том, что при озонировании в интервале от 3 до 4 ч интенсивность оптического поглощения супернатанта увеличивалась, примерно, на 63%, а с 4 до 5 ч – всего на 0.06%. Дальнейшее увеличение продолжительности озонирования не приводило к росту концентрации пероксидных групп. Как оказалось, образующиеся при этом поверхностные пероксиды сохраняются при комнатной температуре, по крайней мере, в течение трех месяцев.

Таблица 4.2 – Результаты йодометрического титрования образца кремнезема Si-500 после озонирования (зависимость величины оптического поглощения супернатанта от продолжительности озонирования).

Продолжительность обработки озоном, ч	Интенсивность пика при $\lambda = 352$ нм
0.5	0.094
1.0	0.128
2.5	1.982
3.0	2.034
4.0	3.249
5.0	3.251

Доказательством одновременного присутствия радикалов на поверхности обработанного озоном кремнезема служат результаты ЭПР-анализа.

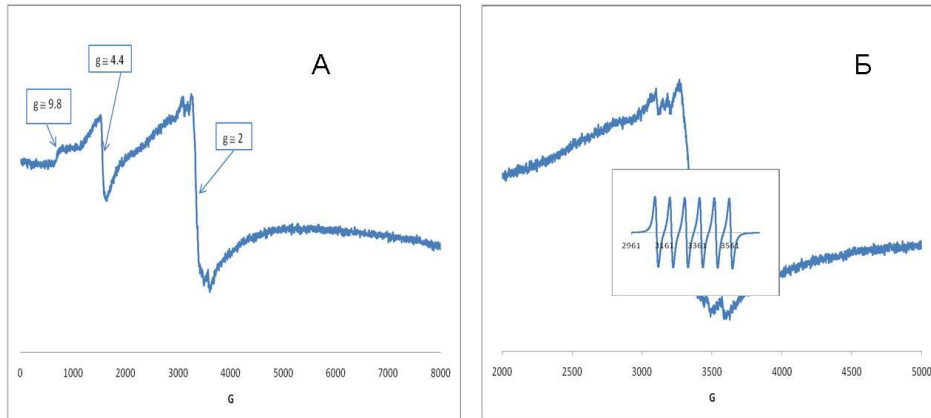


Рисунок 4.20 – ЭПР-спектры кремнезема Si-500, предварительно обработанного озоново-воздушной смесью в течение 4 ч. А, Б - пошаговые аппроксимации структуры спектра.

Установить природу парамагнитных центров, получаемых в результате обработки поверхности кремнезема озоном, можно с помощью ЭПР-анализа. Предполагая, что такие центры имеют радикальную природу, следует ожидать получения как минимум два различных типа спектров ЭПР. В случае образования радикала на атомах кремния расщепление электронного сигнала должно приводить к появлению трех пиков из-за присутствия протона (ядерный спин $J = 1/2$). Присутствие атомов кислорода и кремния не приводит к расщеплению сигнала ($J = 0$). Далее, учитывая наличие примесей оксида алюминия в диоксиде кремния, следует ожидать изменения формы ЭПР-спектра. При этом присутствие различных молекулярных структур должно приводить к получению спектров с разным количеством пиков (кратным 3 из-за наличия протона или кратным 6 из-за наличия алюминия, поскольку ядерный спин атома алюминия $J = 5/2$). Реальные спектры полученных образцов сорбента представлены на Рисунке 4.20. Анализ структуры спектров подтвердил теоретически ожидаемые параметры спектра и, соответственно, радикальную природу активных центров, образующихся с участием примесей оксида алюминия в кремнеземной матрице.

Обработанный озоном кремнезем использовали в качестве гетерогенного инициатора полимеризации мономеров, полимеризующихся по различным механизмам, причем активированная поверхность одновременно являлась носителем при синтезе полимерсодержащих композитов. В присутствии кремнеземных частиц, предварительно обработанных озоном, проводили радикальную полимеризацию ТФЭ

(для доказательства присутствия поверхностных радикалов) и окислительную полимеризацию анилина (с использованием поверхностных пероксидов).

Было установлено, что в результате контакта обработанного озоном кремнезема с ТФЭ при комнатной температуре протекает полимеризация этого газообразного мономера в поверхностном слое носителя. Выход полимера (ПТФЭ) зависел от содержания оксидов алюминия в кремнеземе. В частности, материал, полученный на основе макропористого стекла марки Proligo-500 (Proligo Biochemie GmbH), содержал 8 – 11.5 % полимерной фазы (от общей массы композита), в то время как материал, полученный на основе кремнезема Si-500 (ЗАО Химтех, Армения), содержал 21.0 – 25.5% иммобилизованной полимерной фазы.

С целью повышения смачиваемости и селективности получаемых материалов в процессах биосепарации (например, при разделении фракций НК, различающихся вторичной структурой) указанные образцы кремнезёмов модифицировали сополимерами ТФЭ с аллиламином (АА) или с аллиловым спиртом (АС) с целью введения дополнительных функциональных групп, а также гексафторпропиленом (ГФП) для стабилизации радикалов на концах растущих цепей ПТФЭ, подобно тому, как это делалось при использовании радиационной технологии [136]. Сомономеры вводили либо одновременно в виде смеси в паровой фазе, либо в режиме пост-полимеризации, вводя второй мономер после завершения полимеризации ТФЭ на первом этапе модификации. В последних случаях в полученных композитах было определено повышенное содержание поверхностных amino- или гидроксильных групп, соответственно (Таблица 4.3).

ТФЭ, АА и АС полимеризуются только по радикальному механизму. Следовательно, обработанный озоном кремнезем можно рассматривать в качестве эффективного радикального гетерогенного инициатора. Оказалось, что активированный обработкой озоном кремнезем способен инициировать полимеризацию других мономеров, полимеризующихся по радикальному механизму, таких, например, как стирол и акриламид.

В результате полимеризации стирола в присутствии активированного кремнезема были получены образцы пористых композитов с содержанием поверхностной полимерной фазы до ~ 25% масс., а в результате полимеризации акриламида в присутствии активированного обработкой озоном кремнезема и N,N'-метилена-*бис*-акриламида получали ПААГ гели различной плотности в зависимости от соотношения использованных реагентов.

Таблица 4.3. - Содержание введенных поверхностных функциональных групп в полученных композитах (показанные численные данные являются средними значениями \pm SD, n = 3).

Способ получения	Содержание полимерной фазы, % (w/w)*	Вводимые функциональные группы	Поверхностная концентрация введенных функциональных групп, мкмоль/г**
сополимеризация ТФЭ с АА	21.6	-NH ₂	25.1
графт-сополимеризация ТФЭ с АА	24.7	-NH ₂	240.4
сополимеризация ТФЭ с АС	21.4	-ОН	23.5
графт-сополимеризация ТФЭ с АС	24.6	-ОН	221.8

* определяли гравиметрически;

** содержание аминогрупп определяли титрованием, содержание гидроксигрупп – элементным анализом.

Полученные гели содержали в своем объеме частицы активированного кремнезема (поскольку синтез проводили при перемешивании).

Не менее важный результат был получен при использовании обработанного озоном кремнезема в качестве носителя при получении ПАНИ-модифицированных сорбентов. Было сделано предположение, что активные пероксидные группы на поверхности носителя будут способны инициировать окислительную полимеризацию анилина в отсутствие традиционных для таких систем окислителей, растворимых в реакционной среде. В этом случае окислительная полимеризация анилина должна инициироваться гетеропероксидами, образующимися на поверхности кремнезема при обработке озоном, в результате чего станет возможным получение сорбентов, покрытых прочно удерживающимся на поверхности носителя слоем ПАНИ.

Было установлено, что при инкубировании обработанного озоном кремнезема в подкисленном водном растворе анилина, не содержащем низкомолекулярного окислителя, ПАНИ образуется только на поверхности носителя, что наглядно проиллюстрировано на Рисунке 4.21. Левая колонка с фотографиями на этом рисунке относится к случаю окислительной полимеризации анилина в присутствии неактивированного кремнезема, растворенного низкомолекулярного окислителя (персульфата аммония) и допанта (соляной кислоты). Видно, что в надосадочной жидкости образуется значительное количество полимерных частиц. Напротив, фотографии в правой колонке демонстрируют, что ПАНИ формируется в виде

покрытия на поверхности частиц носителя, а образование взвеси полимерных частиц в реакционном объеме не наблюдается. По-видимому, пероксидные группы на поверхности носителя служат в качестве центров полимеризации, и последующий рост макромолекул ПАНИ происходит в приповерхностном слое носителя. Равномерность и сплошность образующегося ПАНИ-покрытия подтверждены данными ртутной порометрии и тестами на гидролитическую стабильность. Определенная методом ртутной порометрии толщина полимерного покрытия составила, в среднем, 8.5 нм. Полученный ПАНИ-содержащий материал оказался в 7 раз более стабильным в условиях щелочного гидролиза по сравнению с немодифицированным кремнеземом.

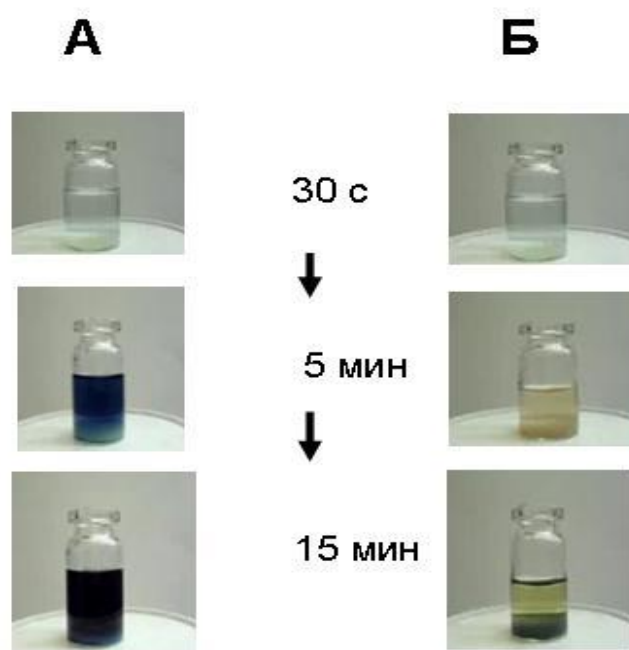


Рисунок 4.21 - Результаты полимеризации анилина в различных условиях: А – окислительная полимеризация в присутствии немодифицированного кремнезема; Б – полимеризация на поверхности кремнезема, предварительно обработанного озоном (адаптировано из [382]).

Основные морфологические характеристики полученных материалов представлены в Таблице 4.5. Как ожидалось, сравнение ртутных порограмм образцов кремнезема до и после модификации показало, что пористость материала после модификации в значительной степени сохраняется, с учетом того, что диаметр пор уменьшается за счет толщины образованного полимерного покрытия. Близкие морфологические характеристики были получены для образцов МПС, модифицированных слоем ПТФЭ методом пост-полимеризации ТФЭ [134, 136, 236].

Тот факт, что в результате полимеризации образуется сплошное полимерное покрытие, подтверждается данными теста на стабильность полученных материалов в условиях щелочного гидролиза (образцы выдерживали 15 ч в растворе 0.01M NaOH, pH = 12). Гидролитическая стабильность полученных композитов, в среднем, в 10 раз превышала стабильность исходного немодифицированного кремнезема (Таблица 4.5).

Активные радикалы, образующиеся на поверхности обработанного озоном кремнезема, сохраняли способность инициировать радикальную полимеризацию в течение, по крайней мере, трех месяцев (образцы хранили при комнатной температуре).

Таким образом, активация поверхности кремнезема озоном является основой для относительно простого и воспроизводимого способа получения кремнеземных сорбентов, модифицированных покрытиями таких различных полимеров, как ПТФЭ и ПАНИ. Поскольку ТФЭ, АА и АС полимеризуются по радикальному механизму, а анилин - по окислительному механизму, - обработанный озоном кремнезем можно рассматривать в качестве универсального гетерогенного инициатора полимеризации.

4.1.2.5. ПАНИ-содержащие сорбенты на основе гидрофобизованного носителя

Рассмотренные выше способы активации поверхности кремнеземных носителей, разработанные с целью локализации полимеризации вводимых в реакционную систему мономеров на поверхности кремнеземного носителя, предусматривали химическое модифицирование поверхностных групп носителя, т. е. изменение функциональности поверхности. В одном из вариантов речь шла о технологии, предусматривающей гидроксिलирование поверхности кремнезема с последующей обработкой аminosиланом, приводящей к пришивке активных аминогрупп, связанных молекулярными спейсерами с поверхностью носителя. В дальнейшем на полученной активированной поверхности иммобилизовали полисульфокислоты, являющиеся донорами протонов, необходимых для полимеризации анилина. Во втором случае активация поверхности носителя достигалась химической обработкой озоном примесей оксида алюминия, содержащихся в кремнеземе.

Эти технологии удается относительно легко масштабировать при переходе от граммовых количеств к стограммовым. Однако, при необходимости получения более крупных партий сорбентов (от 1 кг и более) себестоимость получаемого продукта резко возрастает, поскольку для перемешивания и равномерного распределения

компонентов реакционной смеси требуется специальное дорогое оборудование. Кроме того, при обработке крупных навесок носителя не всегда удается добиться строгой воспроизводимости сорбционной емкости материала (из-за различий в толщине или неоднородности полимерного покрытия, как в разных партиях продукта, так и в объеме одной партии).

Прежде чем приступить к обсуждению еще одного разработанного технологичного и масштабируемого способа получения ПАНИ-содержащих композиционных сорбентов, целесообразно обратиться к работам (в частности, процитированным в литературном обзоре), в которых подробно обсуждается механизм полимеризации анилина. Так, в работе [296] было экспериментально подтверждено, что на стадии индукционного периода полимеризации анилина образуются гидрофобные феназинсодержащие олигомерные продукты. Разумно предположить, что синтез ПАНИ можно локализовать на поверхности гидрофобизованной матрицы, такой как кремнезем, предварительно обработанный фторполимером.

С этой целью поверхность частиц кремнезема обрабатывали раствором фторопласта-42Л (ФП) в ацетоне методом кастинга в специально изготовленном стеклянном реакторе (Рисунок 4.22), в результате чего после ультразвуковой обработки и последующего удаления растворителя на поверхности носителя осаждалось нанотолщинное гидрофобное ФП-покрытие (Рисунок 4.23). При добавлении навески такого гидрофобизованного носителя в реакционную смесь, содержащую анилин, соляную кислоту и окислитель (персульфат аммония), образующиеся в процессе полимеризации гидрофобные олигомеры прочно сорбировались на гидрофобизованной поверхности, служащей в данном случае «матрицей», удерживающей растущие макромолекулы ПАНИ.

В результате анилин расходовался преимущественно на образование ПАНИ-покрытия на поверхности носителя. Доля мономера, израсходованного на образование полимерных частиц в объеме реакционной смеси, уменьшилась в 6 – 8 раз (в зависимости от марки использованного кремнезема - Proligo-500 или Si-500, соответственно) по сравнению с методами, основанными на синтезе ПАНИ-содержащего сорбента в присутствии немодифицированного кремнезема.



Рисунок 4.22 – Реактор для нанесения ФП-покрытия на поверхность частиц объемно-пористого кремнезема методом кастинга.

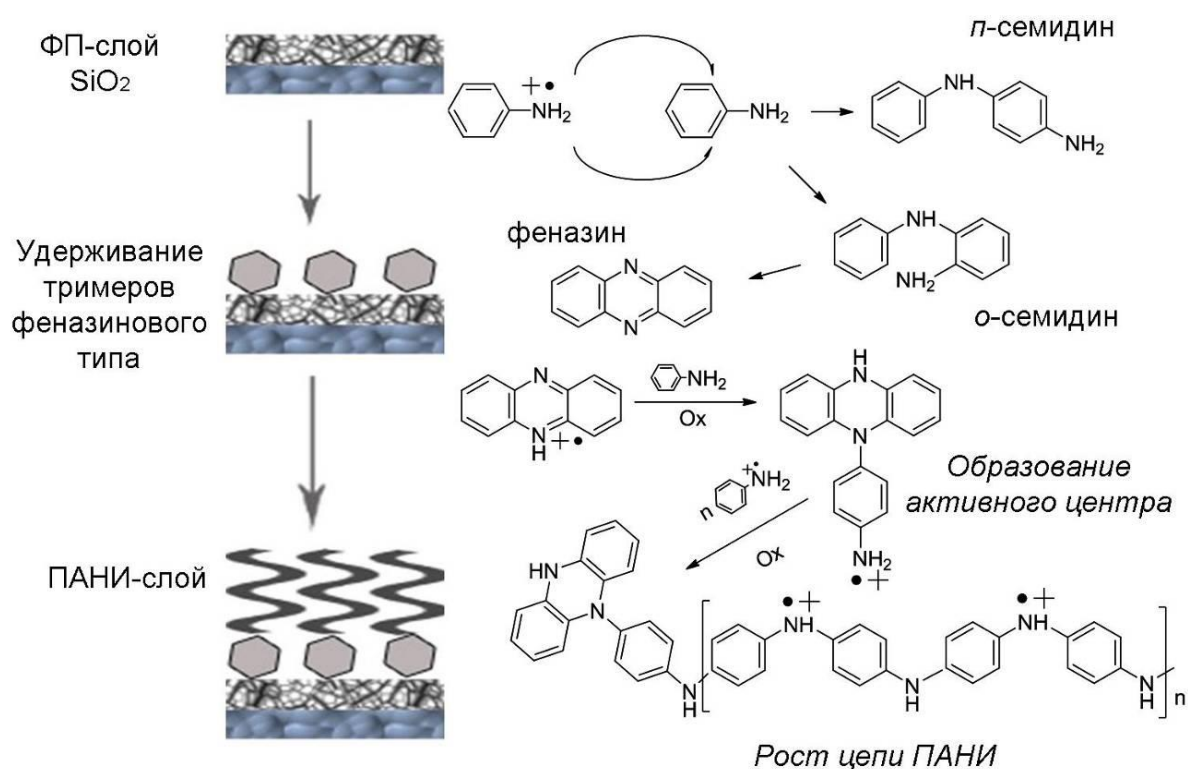


Рисунок 4.23 - Схема получения ФП-ПАНИ-сорбента.

Полезный технологический эффект от применения разработанного способа определяется в особенности тем, что для локализации полимеризации анилина на поверхности носителя не требуется использовать дополнительные сомодификаторы (такие как ПСК), а также нет необходимости в предварительной химической

активации поверхности носителя (за счет обработки кремнезема аminosиланами или воздушно-озоновой смесью).

Еще одно преимущество разработанного способа состоит в том, что условия проведения полимеризации анилина на гидрофобизованной поверхности не требуют проведения дополнительной стадии обработки водным аммиаком для ограничения роста цепей, образующих взвесь полимерных частиц в объеме реакционной смеси, которая необходима при получении ПАНИ-содержащих сорбентов в присутствии неактивированных объемно-пористых носителей.

Полученные описанным способом сорбенты, одновременно содержащие ПАНИ- и ФП-фазы, оказались (как будет показано ниже) особенно эффективными при одностадийном выделении и очистке НК из лизатов крови, что достигается за счет оптимального соотношения фторполимерной фазы и макромолекул ПАНИ, входящих в состав полимерного покрытия сорбента.

Разработан регламент № 02072010 на опытно-лабораторное производство композиционного сорбента Si-500-ФП-ПАНИ.

4.2. Способы получения ПАНИ-содержащих композитов на основе *не* кремнеземных носителей

ПАНИ-покрытия можно получать на различных неорганических или органических подложках. В зависимости от свойств подложки можно синтезировать ПАНИ-содержащие композиты с требуемыми механическими, морфологическими и сорбционными характеристиками. При выборе носителя также необходимо учитывать особенности конструкции биосепарирующего элемента, в состав которого будет включен синтезируемый композит.

4.2.1. Получение ПАНИ-содержащих сорбционных материалов на основе стеклянных мультикапилляров

В результате использования мультикапиллярных (МК) систем в качестве носителей при получении ПАНИ-модифицированных сорбционных материалов могут быть реализованы особые преимущества по сравнению с использованием объемно-пористых дисперсных носителей. Например, с помощью МК легче контролировать точный объем анализируемой пробы (что особенно важно при количественном

выделении). Способы выделения НК на дисперсных сорбентах в составе миниатюрных спин-колонок предусматривают использование небольших объемов проб (20 - 200 мкл), что увеличивает продолжительность пробоподготовки в некоторых областях, например, при неинвазивной диагностике. Так, в случаях, когда проводится выделение минорных компонентов из больших (до 10 мл и более) объемов, требуется обязательное предварительное концентрирование пробы. Применение же МК-систем делает возможным выбор МК подходящего объема.

При использовании МК, впаянных в наконечники для дозаторов, не требуется дополнительное оборудование (центрифуги, различные насосы и пр.), которое необходимо при использовании мини-колонок, содержащих порошковые сорбенты или мембраны. Процесс выделения биополимеров с помощью модифицированных МК проще автоматизировать по сравнению с выделением с использованием мини-колонок с дисперсным или мембранным сорбентом за счет меньшего числа компонентов в системе.

Модифицировать поверхность МК анилинсодержащими покрытиями можно, по крайней мере, двумя способами. Первый способ предусматривал заполнение объема МК реакционной смесью и проведение окислительной осадительной полимеризации анилина, протекающей как на внутренней поверхности стенок капилляров так и в их объеме. Образующиеся на поздних стадиях процесса полимерные частицы, слабо связанные с полимерным покрытием, можно будет легко удалить простой промывкой (в отличие от систем на основе объемно-пористых дисперсных носителей). При реализации второго способа в качестве полимерного модификатора могут быть использованы невязкие растворы заранее приготовленных сополимеров анилина с замещенными анилинами подходящего состава.

При разработке технологического способа модифицирования поверхности стеклянных МК нанослоями ПАНИ было протестировано 12 вариантов МК, изготовленных и предоставленных ООО НПП «Наноструктурные Технологии Стекла» (Россия) со следующими геометрическими характеристиками: (диаметр индивидуального капилляра, мкм) x (толщина МК, мм) x (длина МК, мм) - 20x2x30, 20x2x60, 30x3x60, 40x2x30, 40x2x100, 40x3x50, 40x4x20, 40x4x60, 40x6x20, 40x6x60, 40x6x100 и 40x6x300. Подбирали МК с такими геометрическими параметрами, которые обеспечивали бы равномерное распределение ПАНИ-покрытия по внутренней поверхности индивидуальных капилляров в условиях, позволяющих проводить полуавтоматическое модифицирование МК и последующую отмывку от избытка компонентов реакции и не связанных с поверхностью частиц ПАНИ.

В качестве примера на Рисунке 4.24 представлена структура МК с размерами 40 мкм x 4 мм x 20 мм.

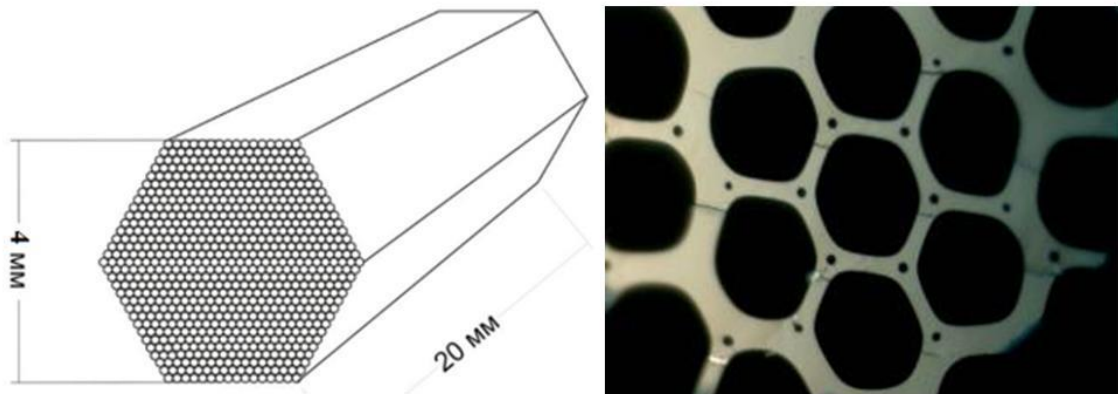


Рисунок 4.24 - МК с геометрическими параметрами: 40 мкм x 4 мм x 20 мм.

В предварительных экспериментах модифицирование поверхности МК проводили с помощью ручного механического дозатора (присоединяя к нему МК отрезком подходящего силиконового шланга) или (в случае модифицирования МК-трубки длиной 300 мм) с помощью перистальтического насоса LKB Bromma 2132 Microperplex (Швеция).

Для обработки предоставленных МК использовали соотношение анилин:кислота:окислитель, равное 1:3:1. Отбирали 200 мкл полученного раствора и охлаждали до 10 - 11°C. Добавляли 60 мкл водного раствора персульфата аммония. В МК набирали реакционную смесь и инкубировали 20 мин при комнатной температуре или при +4°C. Процедуру повторяли. По окончании полимеризации МК промывали водой, этанолом и сушили 4 ч при 80°C. В результате были получены серии модифицированных ПАНИ-покрытием МК с различными геометрическими параметрами, образцы которых представлены на Рисунке 4.25.

Оценивали равномерность распределения полимерного покрытия по поверхности капилляров, проницаемость капилляров, а также эффективность полуавтоматического модифицирования с помощью перистальтического насоса по сравнению с ручным методом.

Модифицирование МК при комнатной температуре не вызывало трудностей. Однако в случае МК с диаметром капилляров 20 мкм в некоторых случаях образовывались полимерные пробки, препятствующие пропусканию через модифицированный МК водной смеси ДНК тимуса теленка с БСА. При однократном модифицировании МК с диаметром капилляров 30 мкм полимерные пробки не образовывались, однако после повторной обработки реакционной смесью (с целью

получения более однородного покрытия) в некоторых образцах существенно увеличивалось сопротивление при пропускании модельной смеси. Оптимальными носителями оказались МК с диаметром капилляров 40 мкм. Дальнейшее увеличение диаметра капилляра нецелесообразно, поскольку при этом существенно снижается эффективная поверхностная емкость МК-системы.



Рисунок 4.25 – МК, модифицированные ПАНИ-покрытием, с различными геометрическими параметрами.

При модифицировании при пониженных температурах процесс заметно замедлялся (с 30 мин до 4 – 4.5 ч). Это приводило к уменьшению количества полимерных пробок в просветах узких капилляров (с диаметром 20 мкм). Однако различий в качестве полимерного покрытия поверхности более широких капилляров, обработанных при комнатной и при пониженной температуре, отмечено не было.

Интенсифицировать и масштабировать процессы модифицирования и отмывки удалось с помощью многоканального перистальтического насоса Heidolf Pumpdrive 5201 (Германия) с 4-мя насадками с диаметром шлангов не менее 3 мм. Шланги должны быть прозрачными (для контроля подачи жидкости) и выполненными из специального химически стойкого силикона (Рисунок 4.26). Этот подход позволил одновременно обрабатывать 4 заготовки МК длиной до 30 см (промодифицированные МК затем легко нарезались до нужной длины).



Рисунок 4.26 – Установка для одновременного модифицирования ПАНИ-нанослоями внутренней поверхности МК (длиной до 30 см) с помощью многоканального перистальтического насоса.

По результатам исследований были выбраны МК с оптимальными геометрическими параметрами: 40 мкм х 4 мм х 30 см. Было показано, что модифицирование МК ПАНИ-покрытиями целесообразно проводить при комнатной температуре с использованием перистальтического насоса, что обеспечивает равномерное заполнение МК-системы модифицирующей смесью, а также быструю эффективную отмывку модифицированных МК от остатков реакционной смеси (затраты времени на модифицирование и отмывку по сравнению с ручной процедурой снижаются примерно вдвое).

Отмытые и высушенные ПАНИ-модифицированные МК нарезали на отрезки (по 60 мм) и впаивали в пластиковые наконечники для механических дозаторов в соответствии с технологией, разработанной в ООО НПП «Наноструктурные Технологии Стекла» (Россия).

Через полученные МК-наконечники пропускали деионизованную воду, водные растворы аммиака или соляной кислоты (различной концентрации), буферные растворы Б1 и Б2, смесь (Б1+Б2), а также лизат плазмы крови человека. Способ приготовления лизата с использованием буферных растворов Б1 и Б2 и их состав приведен в Главе 2. Указанные жидкости (по 200 мкл) втягивали в МК-наконечник с помощью дозатора, и через определенное время выдавливали полученные элюаты на слой фильтровальной бумаги (указанную операцию повторяли для каждого образца

по 4 раза). Из данных Таблицы 4.4 следует, что при рН 6.5 - 10.0 полимерное покрытие на МК, впаянных в пластиковые наконечники в результате термической обработки при 200°C, оказывается неустойчивым после последовательного выдерживания в течение 30 с двух и более порций воды (рН 6.5) или водных растворов аммиака (рН от 7.0 до 10.0). Однако, при пропускании растворов Б1, Б2, их смеси или лизата плазмы крови покрытие оставалось стабильным. Раствор Б1 содержал Трис·НСl, хлорид кальция и сахарозу, раствор Б2 - Трис·НСl и протеиназу К. Лизат, помимо солюбилизованных компонентов плазмы крови, содержал компоненты растворов Б1 и Б2. Стабильность ПАНИ-покрытия при контакте с указанными смесями, по-видимому, можно объяснить стабилизирующим действием солюбилизованных молекул белков и сольватированных ионов. А в присутствии разбавленной низкомолекулярной кислоты стабилизация покрытия объясняется, по-видимому, протонированием ПАНИ и его переходом в наиболее устойчивую форму гидрохлорида эмеральдина. Кажущаяся устойчивость покрытия (отсутствие окрашивания элюата) при обработке водным аммиаком при рН 11.0 может быть связана с переходом в элюат частиц бесцветного депротонированного лейкоэмеральдина.

Таким образом, было показано, что на устойчивость ПАНИ-покрытия на поверхности стеклянных МК оказывают влияние как состав, так и рН пробы. Покрытие остается устойчивым в диапазоне рН от 5.0 до 9.0 при контакте с биологическими смесями и их лизатами.

Таблица 4.4 - Устойчивость ПАНИ-покрытия, нанесенного на внутреннюю поверхность МК в зависимости от рН и состава среды (относительная интенсивность окрашивания элюатов отмечена количеством значков «+»).

Среда	рН	Количество смывов	Цвет элюата
лизат	8.5-9.0	4	б/цв
Б1	8.0	4	б/цв
Б2	5.0	4	б/цв
Б1 + Б2	7.5-8.0	4	б/цв
HN ₄ OH aq	11.0	4	б/цв
HN ₄ OH aq	10.0	2	+
HN ₄ OH aq	9.0	2	++
HN ₄ OH aq	7.0	4	++++
вода	6.5	4	+
вода + HCl	5.0	4	б/цв
вода + HCl	4.0	4	б/цв
вода + HCl	3.0	4	б/цв
вода + HCl	1.0-2.0	4	б/цв

Проницаемость модифицированных МК оценивали, пропуская через них модельную смесь, содержащую 10 мкг ДНК тимуса теленка и 550 мкг БСА. МК-наконечник промывали смесью (несколько раз последовательно втягивая и выдавливая 100 мкл смеси), затем втягивали эту аликвоту в МК-наконечник и инкубировали при комнатной температуре 3 мин. Выдавленный из МК элюат анализировали электрофоретически. Результаты электрофореза представлены на Рисунке 4.27.

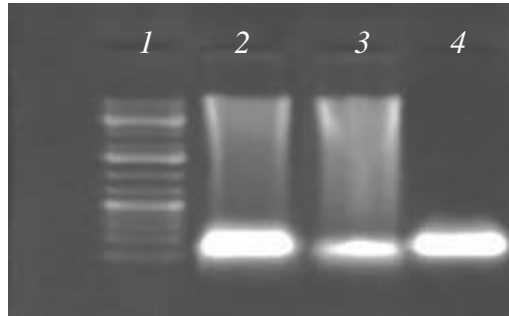


Рисунок 4.27 - Электрофорез в 0.8% агарозном геле. 1 – маркер, 2 – исходная смесь ДНК-белок, 3 – элюат из МК-ПАНИ-наконечника (40 мкм x 4 мм x 6 см) без инкубирования (двукратное промывание), 4 – элюат из МК-ПАНИ-наконечника после промывки и инкубирования (3 мин).

Полученный результат подтвердил, что МК-структуры шириной 4 мм и длиной 60 мм, с капиллярами диаметром 40 мкм, оптимальны для выделения биополимеров из биологических образцов. МК-структуры меньшей длины не позволяют набирать достаточный для эффективной экстракции НК объем образца, а МК-структурами длиной свыше 100 мм сложно манипулировать.

МК шириной 4 мм могут быть впаяны в стандартные пластиковые наконечники для ручных или автоматических дозаторов. Такие наконечники также можно присоединять к шприцу, что позволяет при необходимости проводить работу с большими объемами образца.

Разработанная в рамках проведенного исследования технология модифицирования поверхности МК ПАНИ-покрытиями и условия впаивания модифицированных МК в пластиковые наконечники для дозаторов (шприцев) запатентована [383]. Доказанная возможность получения стойких нанотолщинных ПАНИ-покрытий на внутренней поверхности МК позволяет говорить о ПАНИ как о перспективном полимерном модификаторе, пригодном для использования в микрофлюидных системах, поскольку разработанный способ модифицирования поверхности капиллярных систем нанотолщинными ПАНИ-покрытиями можно

непосредственно использовать для получения функционализированных микрофлюидных блоков.

4.2.2. Синтетические мембраны в качестве носителей при получении ПАНИ-содержащих сорбционных материалов

Синтетические полимерные мембраны удовлетворяют основным требованиям, предъявляемым к носителям для получения полимерсодержащего сорбента, таким как жесткость каркаса, развитая поверхность, стойкость к взаимодействию с органическими растворителями и с различными агрессивными средами, ненабухаемость, термическая и гидролитическая стабильность, возможность в широких пределах изменять структурные характеристики (величина удельной поверхности, структура и размер пор). Несмотря на то, что подобные свойства присущи дисперсным жестким носителям, например, кремнеземным, в ряде случаев использование мембраны позволяет значительно упростить и ускорить процесс получения сорбционного материала и изготовление биосепарирующего элемента (микроколоники или картриджа). При выборе мембран в качестве носителя также учитывали возможность проведения относительно простой процедуры утилизации мембран. Отработанные мембраны относятся к твердым отходам, для которых разработаны способы их сжигания или микробного разложения.

В настоящем исследовании использовали синтетические мембраны, изготовленные из различных полимеров, в частности, 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). Поскольку промышленностью выпускается широкий ассортимент таких материалов с различной пористостью, было необходимо выбрать наиболее подходящие варианты для использования их в качестве носителей.

Для модифицирования каждого отрезка мембраны площадью 100 см² (одновременно с обеих сторон) одним слоем ПАНИ требуется 5.85 мл 37%-ной соляной кислоты и 2.095 мл анилина, смешанных в 210 мл воды, а также 4.56 г персульфата аммония (при соотношении мономер:допант:окислитель = 1:3:1). Массовая доля ПАНИ-покрытия в составе полученных композитных мембранных

сорбентов составила 10 – 25 %. Так, в результате проведения однократной процедуры модифицирования прирост массы образца модифицированной мембраны по сравнению с массой исходной мембраны составил 10 ± 0.1 % (в среднем, 9.91 %). При двукратном последовательном модифицировании - 20 ± 0.1 % (в среднем, 19.97 %), а при троекратном - 25 ± 0.1 % (в среднем, 24.94 %).

Поверхность мембран также модифицировали ПАНИ при соотношении мономер:допант:окислитель, равном 1:10:1. Модифицированные мембраны отмывали водно-этанольной смесью (1:1 об./об.) и высушивали при 45°C в сушильном шкафу в течение 6 ч.

Как оказалось, наиболее равномерно распределенное ПАНИ-покрытие образуется на поверхности мембран МФФК-Г и ММК. Внешний вид некоторых образцов ПАНИ-модифицированных мембран представлен на Рисунке 4.28.

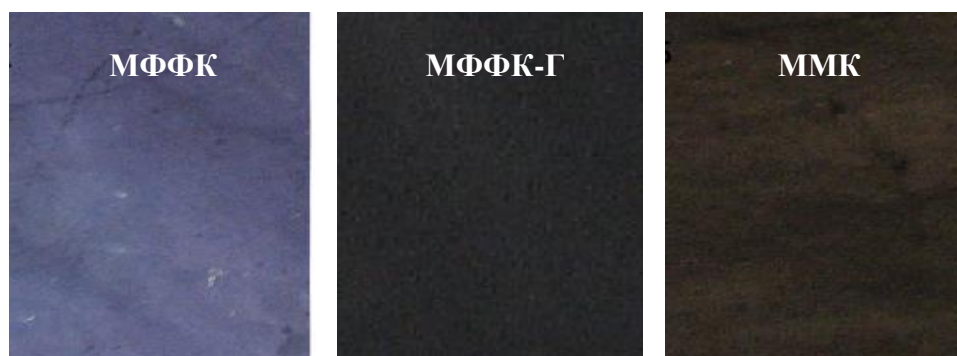


Рисунок 4.28 - Внешний вид ПАНИ-модифицированных мембран (образцы 20 x 28 мм).

Ранее мы показали, что при соотношении мономер:допант:окислитель, равном 1:3:1, конверсия анилина, как правило, достигает 60%. Относительно неглубокую конверсию, по-видимому, можно объяснить быстрым исчерпанием окислителя, так как при добавлении новой порции окислителя после практически полной остановки полимеризации реакция возобновляется и протекает вплоть до полной конверсии мономера. Таким образом, данное соотношение реагентов принимали оптимальным при получении ПАНИ покрытий на кремнеземных матрицах. Однако, при модификации ряда мембран (включая мембраны МФФК) при соотношении мономер:допант:окислитель, равном 1:3:1, ПАНИ покрытие оказывалось неравномерным и слишком тонким. Из результатов исследования, приведенных в подразделе 3.1.2.5 диссертации следует, что фторопластовая мембрана (МФФК) должна служить эффективной подложкой, на которой анилин полимеризуется с

образованием равномерно распределенного покрытия за счет образования гидрофобных феназин-содержащих олигомеров на первых стадиях процесса, которые при проведении полимеризации в спиртовой среде (или в водно-органической среде) эффективно сорбируются на фторированной поверхности. Отсутствие данного эффекта при выбранном соотношении мономер:допант:окислитель можно объяснить чрезвычайно низкой смачиваемостью поверхности фторполимерной мембраны в водной среде. Однако, уже при соотношении мономер:допант:окислитель, равном 1:10:1, т. е. при повышенном содержании в реакционной среде свободной кислоты (HCl) на всех исследованных мембранах (включая гидрофобную МФФК) удалось получить равномерно распределенные ПАНИ-покрытия. Наиболее стабильные покрытия были получены на поверхности мембран МФФК и ММК. По-видимому, в случае мембраны МФФК избыток свободных протонов обратимо связывается молекулами воды в ионы гидроксония в такой степени, что частицы катион-радикала $\text{Ph-NH}_2^{+\cdot}$ успевают локализоваться в непосредственной близости от гидрофобной поверхности мембраны, способствуя сорбции образующихся на следующем этапе гидрофобных феназин-содержащих олигомеров, что обеспечивает локализацию процесса полимеризации на поверхности носителя с образованием пернигранилина в случае мембраны МФФК. Данный вывод подтверждается анализом кинетических кривых образования ПАНИ на поверхности МФФК-мембраны (Рисунок 4.29).

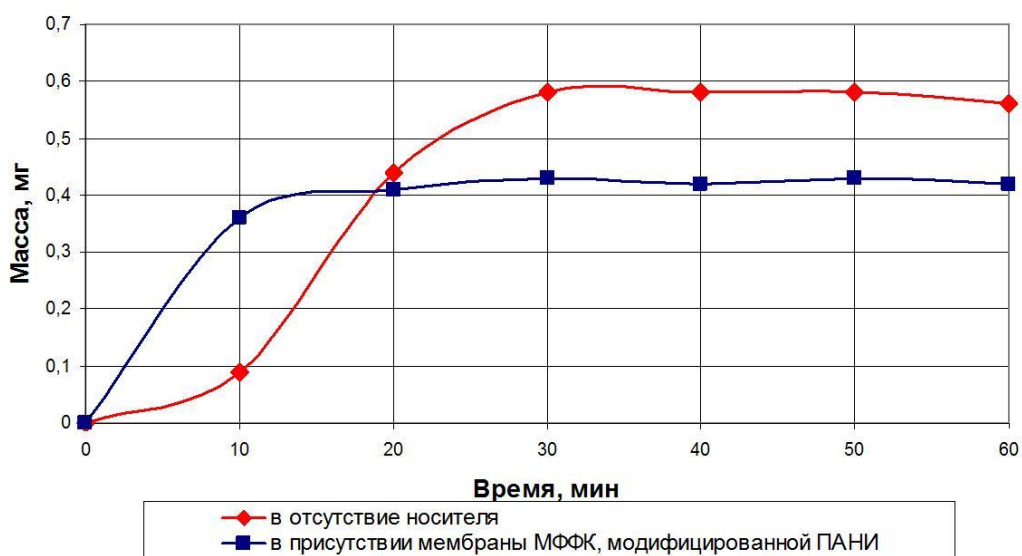


Рисунок 4.29 - Прирост массы ПАНИ (определяли гравиметрически) при полимеризации анилина в отсутствие носителя и в присутствии мембраны МФФК при соотношении мономер:кислота:окислитель 1:10:1.

Микрофильтрационная фторопластовая композиционная мембрана марки МФФК представляет собой пленочный пористый материал на основе фторопласта 42Л (сополимер тетрафторэтилена и винилиденфторида), армированный различными неткаными материалами (полипропилен, лавсан) с размером пор 0.05; 0.15; 0.2; 0.45; 0.65; 0.80 мкм и пористостью 80 - 85%.

Следует отметить, что при использовании мембран марки МФФК-Г удалось получить стабильные ПАНИ-покрытия и при соотношении реагентов 1:3:1. В этом случае требовалось значительно меньшее количество кислоты, что удешевляет процесс и делает его более технологичным.

Таким образом, наиболее перспективными в качестве носителей для ПАНИ-покрытия материалами следует признать мембраны марки МФФК-Г (МФФК-Г-0.20 и МФФК-Г-0.45), на поверхности которых образуется стабильное равномерное ПАНИ-покрытие как при соотношении реагентов 1:3:1, так и при соотношении 1:10:1.

Тем не менее, равномерное ПАНИ-покрытие с характерным металлическим блеском получено также при модифицировании образцов мембраны ММК (Рисунок 4.30).

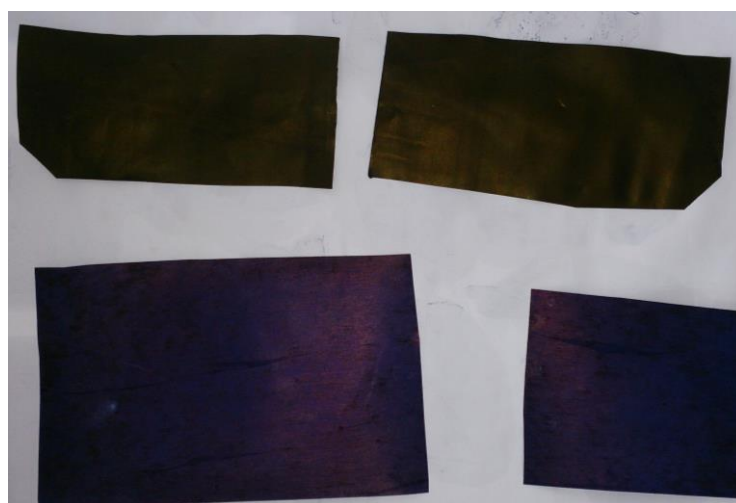


Рисунок 4.30 – Образцы ПАНИ-модифицированных мембран ММК (верхний ряд) и МФФК-Г (нижний ряд) при соотношении реагентов 1:10:1. Хорошо заметен характерный металлический блеск.

С целью подтверждения сохранности элементов исходной структуры мембраны после модифицирования, обеспечивающих удовлетворительную поверхностную емкость, методом сканирующей зондовой микроскопии исследовали морфологию поверхности исходной и модифицированной мембран. С помощью

сканирующего зондового микроскопа «НаноСкан-3D» («ТИСНУМ», г. Троицк, Россия) были получены соответствующие объемные изображения.

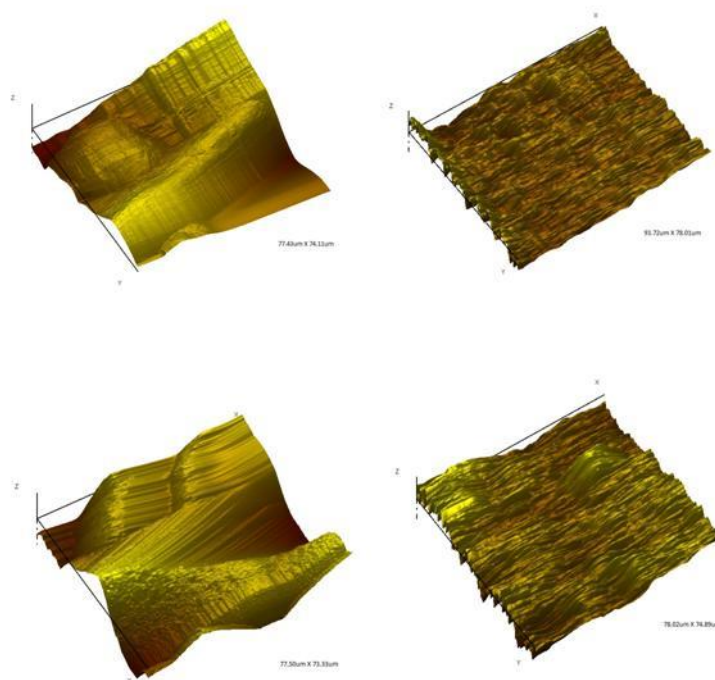


Рисунок 4.31 - 3D-изображения поверхностей мембраны МФФК-Г-0.45. Левый столбец – немодифицированная мембрана, правый столбец – мембрана после модифицирования ПАНИ. Верхняя строка – гладкая поверхность мембраны; нижняя строка - шероховатая поверхность мембраны.

Изображения на Рисунке 4.31 демонстрируют, что в результате модифицирования морфология поверхности мембраны МФФК-Г-0.45 значительно не изменяется (как на шероховатой стороне мембраны – изображения в нижней строке, так и на гладкой стороне – верхние изображения). На изображениях в правом столбце четко визуализируется полимерное покрытие, которое в целом повторяет рельеф поверхности исходной мембраны.

Синтетические мембраны широко используются для производства различных фильтрующих элементов. Как правило, такие элементы содержат в качестве насадки гофрированные мембраны. Поэтому готовые мембраны, которые можно использовать в качестве носителей для получения ПАНИ-модифицированных композитов, нередко предлагаются производителями в гофрированном виде. Процессы отливки, отмывки, сушки, гофрирования и упаковки мембран в картриджи должны быть сопряжены в единую технологическую цепь. При разработке биосепарирующих элементов (БЭ), в которых в качестве сорбента используются модифицированные ПАНИ-покрытием мембраны, представлялось целесообразным сравнить эффективность

модифицирования гофрированных и не гофрированных мембран. Такое сравнение позволяет ответить на вопрос, на какой стадии производства БЭ – до или после гофрирования – целесообразно проводить модификацию поверхности мембраны полимером.

Для решения этой задачи исследовали не гофрированные и гофрированные образцы лавсановых (ПЭТФ) мембран с размерами пор 0.45 мкм (любезно предоставленных ООО НПП «Технофильтр», Россия). Полимеризацию анилина проводили в присутствии мембран при комнатной температуре в двух средах: водной и спиртовой (C_2H_5OH), для определения наибольшей скорости полимеризации при одинаковых объемах реакционной смеси, а также для того, чтобы установить, в какой среде гофрированные мембраны будут лучше смачиваться.

Синтез композиционного мембранного сорбента в водной среде проводили при комнатной температуре. В качестве допанта использовали соляную кислоту. Реакцию проводили в избытке кислоты при соотношении мономер:допант:окислитель, равном 1:3:1). В стеклянный флакон, содержащий водный раствор анилина с соляной кислотой, полностью опускали мембрану. Затем добавляли водный раствор персульфата аммония, полученную смесь интенсивно перемешивали. При этом раствор уже примерно через 70 с начинал приобретать светло-синий цвет, а через 150 с раствор становился темно-синим с зеленым оттенком. Мембраны выдерживали в растворе 30 - 40 мин, после чего промывали водой (Milli Q) и сушили на воздухе.

Синтез ПАНИ-покрытия в спиртовой среде также проводили при комнатной температуре. В качестве допанта использовали соляную кислоту. Но в отличие от модифицирования в водной среде, реакцию проводили в избытке кислоты (использовали соотношение мономер:допант:окислитель, равное 1:7:1). Последовательность проводимых манипуляций была аналогична таковым при синтезе ПАНИ в водной среде. При этом изменения в окрашивании смеси происходили медленнее: через 7 мин 21 с смесь становилась прозрачно-синей, через 9 мин 32 с смесь приобретала темно-синий цвет с зеленым оттенком. Мембраны выдерживали в растворе 30 - 40 мин, после чего промывали водой (Milli Q). Затем мембраны сушили на воздухе.

В результате проведения описанного эксперимента было установлено, что в обеих средах поверхность гофрированной мембраны смачивается не полностью, в отличие от не гофрированных образцов. Поверхность мембраны должна быть покрыта одним – тремя ПАНИ-слоями, в результате чего эффективная толщина покрытия должна составлять от 3 до 10 нм, соответственно, что, в конечном счете, было

достигнуто при использовании не гофрированных образцов, но не достигалось при модифицировании гофрированных мембран.

Была проведена оптимизация процесса модификации мембран с учетом необходимости масштабирования методики в полупромышленном масштабе. Исходная методика включала несколько стадий и основывалась на послойном нанесении полианилина (ПАНИ). Эта методика позволила получить качественные образцы модифицированных мембран, необходимые для проведения исследований, однако принимая во внимание факт, что для послойного нанесения ПАНИ необходимо использовать несколько емкостей с рабочим раствором (число которых равно количеству наносимых слоев + емкость для отмывки), такая схема не представлялась технологичной, т. к. увеличивала временные и сырьевые затраты на производство единицы продукции.

Поэтому было опробовано несколько альтернативных схем модификации мембран и выбрана оптимальная схема на основании подбора оптимальных времени нахождения мембраны в рабочем растворе и концентраций его компонентов. Учитывалось, что в виду большой площади поверхности мембраны необходимо использовать большой объем рабочего раствора, значительная часть которого идет не на формирование слоев ПАНИ на поверхности мембраны, а на образование частиц ПАНИ в «свободном» объеме, которые слабо закрепляются на поверхности мембраны, загрязняя ее поверхность. После отмывки эта часть полимера утилизируется.

Разработанный способ позволяет максимально снизить долю «бесполезного» ПАНИ и использовать минимальное число рабочих камер (а именно две). По результатам исследования подготовлен лабораторный регламент № ЛР 02062014 на опытно-лабораторное производство композиционного сорбента МФК-ПАНИ.

Основные стадии процесса получения ПАНИ-покрытия на поверхности мембран в соответствии с упомянутым регламентом описаны ниже. Процесс модифицирования поверхности мембраны проводится при комнатной температуре (за исключением стадии высушивания) и включает следующие стадии.

Мембрану помещали в емкость, заполненную водно-спиртовым подкисленным раствором анилина и инкубировали 10 – 15 мин при слабом перемешивании. Стадию вакуумирования (обязательную при модифицировании объемно-пористых частиц или монолитов) при использовании мембран осуществлять нецелесообразно в виду удовлетворительной смачиваемости поверхности мембран при проведении реакции в водно-спиртовой среде. В емкость подавали водно-спиртовой раствор окислителя

(объем может варьироваться в зависимости от концентрации и определяется технологической целесообразностью), мембрану инкубировали при слабом перемешивании реакционной смеси до окончания полимеризации (30 – 40 мин). Затем модифицированную мембрану переносили в емкость для отмывки и последовательно отмывали дистиллированной водой, 96%-ным этанолом, еще раз дистиллированной водой (каждым растворителем в течение 20 мин при средней интенсивности перемешивания). Модифицированную мембрану извлекали из промывочной емкости и высушивали при 40°C в токе воздуха. Размещение мембраны в емкостях должно обеспечивать полное смачивание поверхности мембраны раствором мономера и реакционной смесью, но при этом мембрана не должна соприкасаться с дном емкости. При высушивании мембрана также не должна соприкасаться с какой-либо поверхностью (в лабораторном варианте использовали специальный зажим). Упрощенная схема процесса (в лабораторном варианте) представлена ниже (Рисунок 4.32).

Следует отметить, что в условиях реального производства технологическая схема также должна включать узлы резки мембраны (на полоски, приблизительно, 10 x 120-150 мм) и упаковки микроколонок (т. е. собственно БЭ).

Полученный мембранный сорбент разрезали на отрезки 10 x 110 мм и особым образом упаковывали в пластиковые картриджи различной конструкции, получая БЭ. Принцип упаковки иллюстрирует Рисунок 4.33.



Рисунок 4.32 – Схема процесса модифицирования поверхности полимерных синтетических мембран ПАНИ-покрытием.

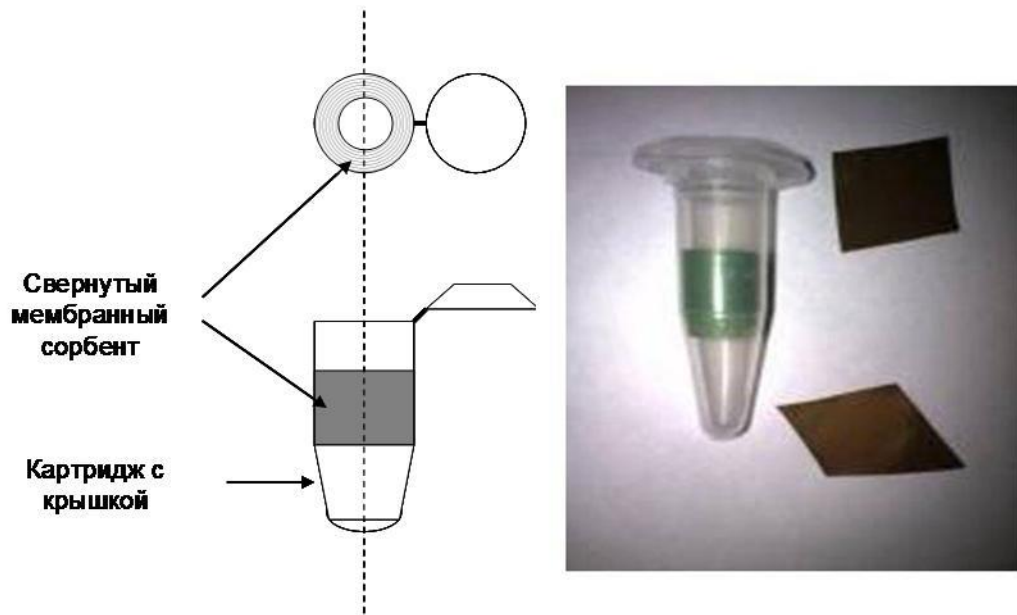


Рисунок 4.33 – Принципиальная схема устройства мембранного БЭ и его внешний вид.

В дальнейшем с целью оптимизации конструкции БЭ в качестве держателей мембраны были использованы специальные пластиковые вставки меньшего диаметра по сравнению с диаметром пробирки-приемника. Это позволило полностью исключить контакт элюата, содержащего очищенную ДНК, с загрязненной примесями мембраной при ее удалении из пробирки-приемника. Плотность упаковки мембранного сорбента составляла $24 - 48 \text{ см}^2/\text{см}^3$, в зависимости от объема наносимого образца.

Разработанный элемент легко вставляется/удаляется из стандартной лабораторной пластиковой минипробирки (имеется в виду вся линейка минипробирок, как с крышками, так и без крышек), что позволяет проводить манипуляции с полученным элюатом без контакта с загрязненной мембраной (Рисунок 4.34).

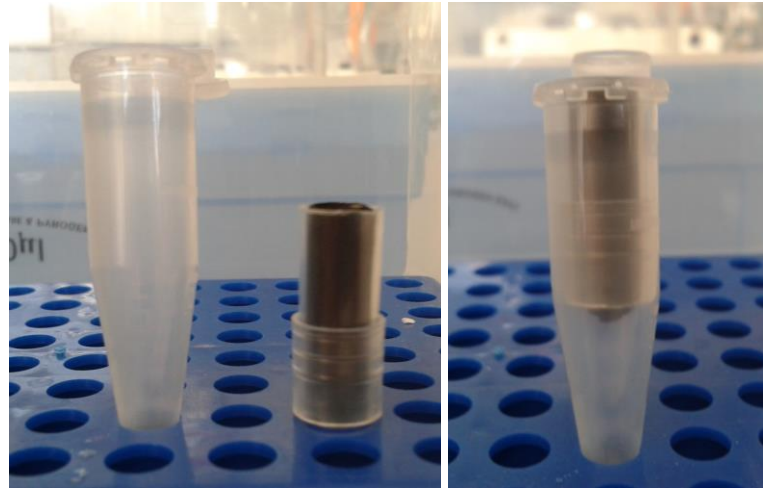


Рисунок 4.34 - БЭ с ПАНИ-модифицированной мембраной в разобранном (слева) и в собранном виде (справа).

Таким образом, при использовании полимерных мембран в качестве носителей при синтезе композиционных ПАНИ-содержащих сорбентов удастся осуществить технологичный способ получения композиционного сорбента (менее трудоемкий по сравнению со способами получения сорбентов на основе дисперсных или капиллярных носителей). Важно подчеркнуть, что модифицированная ПАНИ-покрытием мембрана используется в составе БЭ в качестве селективного сорбента, но не в качестве фильтра, благодаря чему не происходит фильтрация образца через мембрану, но обеспечивается максимальный контакт образца с поверхностью мембраны, а следовательно, осуществляется эффективная сорбция примесей и одностадийная элюция очищенного препарата ДНК в результате последующего быстрого (0.5 – 1 мин) центрифугирования (как будет показано в Главе 5). Разработанный мембранный БЭ является простым, экономически эффективным устройством, предназначенным для экспресс-выделения НК из биологических образцов.

Разработанная технология модифицирования поверхности синтетических мембран ПАНИ-покрытиями и БЭ, содержащий модифицированную мембрану, запатентована [384].

4.3. Морфология, химический состав и гидролитическая стабильность полученных сорбентов

Прежде, чем приступить к обсуждению результатов практического применения БЭ, содержащих разработанные материалы (демонстрирующие эффект «*негативной*

селекции» в отношении НК), целесообразно сравнить их морфологию, химический состав поверхности и химическую стойкость полученных полимерных покрытий в составе этих сорбентов. Такое сравнение даст возможность сделать правильную предварительную оценку потенциальной области применения того или иного композита, проводимую с учетом состава и свойств биологического объекта (смеси), из которого требуется выделить чистую НК для молекулярного анализа.

Образцы всех полученных кремнеземных сорбентов исследовали методами ртутной порометрии (для оценки изменений в морфологии поверхности носителя после модифицирования полимерными нанопокрывтиями) и элементного анализа (для определения доли полимерного компонента в составе композита). Последовательность манипуляций с образцами сорбентов, предназначенных для исследования методом ртутной порометрии, а также математический алгоритм обработки полученных данных об экструзии и интрузии ртути были предварительно отработаны на более хрупких модельных образцах твердых оксидов металлов [385] и силикагелях [137]. С целью проведения сравнительной качественной оценки сплошности полимерного покрытия определяли устойчивость полученных композитов в условиях щелочного гидролиза. Физико-химические основы использованных аналитических методов и последовательность манипуляций, проводимых с целью определения необходимых параметров, приведены в Главе 2 (в подразделе 2.2. Методы).

Полученные данные сведены в Таблице 4.5. Эти данные, в частности, свидетельствуют о том, что пористость исходного носителя в значительной мере сохраняется во всех полученных материалах, в то время как средний диаметр пор несколько уменьшается за счет образования полимерного покрытия. Тот факт, что покрытие образуется не только на внешней поверхности частиц носителя, но и на внутренней поверхности пор, подтверждается одновременным сопоставимым уменьшением удельного объема и среднего эффективного диаметра пор. В качестве примера на Рисунке 4.35 приведены порограммы немодифицированного кремнеземного носителя Si-500 (НИИ «Химтех», Армения) и того же носителя, последовательно покрытого нанослоями Фторопласта 42Л и ПАНИ. Данные элементного анализа позволили рассчитать содержание полимерной фазы в полученных композитах.

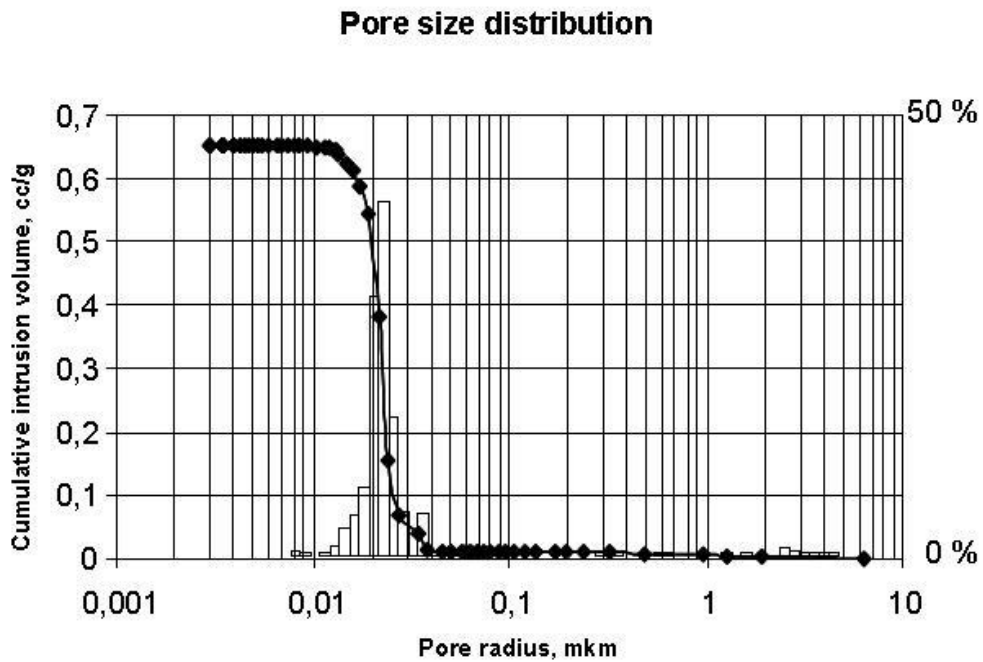
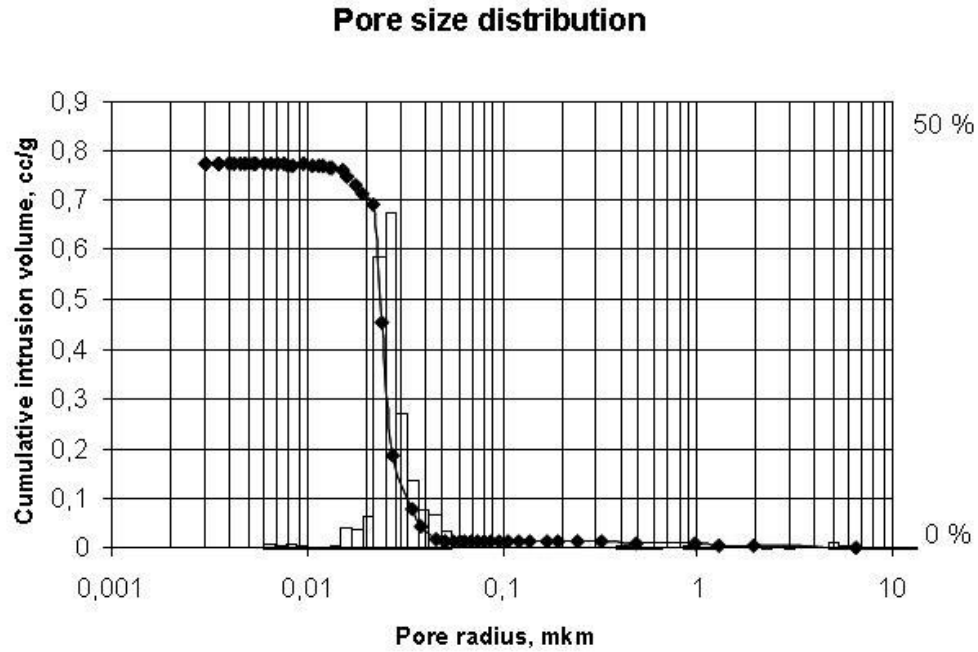


Рисунок 4.35 – Ртутные порограммы немодифицированного кремнезема Si-500 (НИИ «Химтех», Армения) и полученного сорбента Si-500-ФП-ПАНИ.

Сплошность распределения полимерного покрытия подтверждается высокой стойкостью образцов модифицированного кремнезема в условиях щелочного гидролиза силоксановых связей Si-O-Si по сравнению с немодифицированным кремнеземом в сильнощелочной среде по сравнению с немодифицированным кремнеземом. Эффект экранирования неорганической поверхности полимерной фазой

особенно заметно проявляется в первые 70 мин процесса. На Рисунке 4.36 приведены кинетические кривые растворения немодифицированного кремнезема и кремнеземных сорбентов, модифицированных ПАНИ, фторопластом-42Л (ФП) и последовательно нанесенными слоями ФП и ПАНИ. Скорость растворения материала носителя определяли по тангенсу угла наклона кривой растворения. Кривые строили, определяя концентрацию кремниймолибденовой кислоты (при $\lambda = 320$ нм), образующейся в соответствии с реакцией:

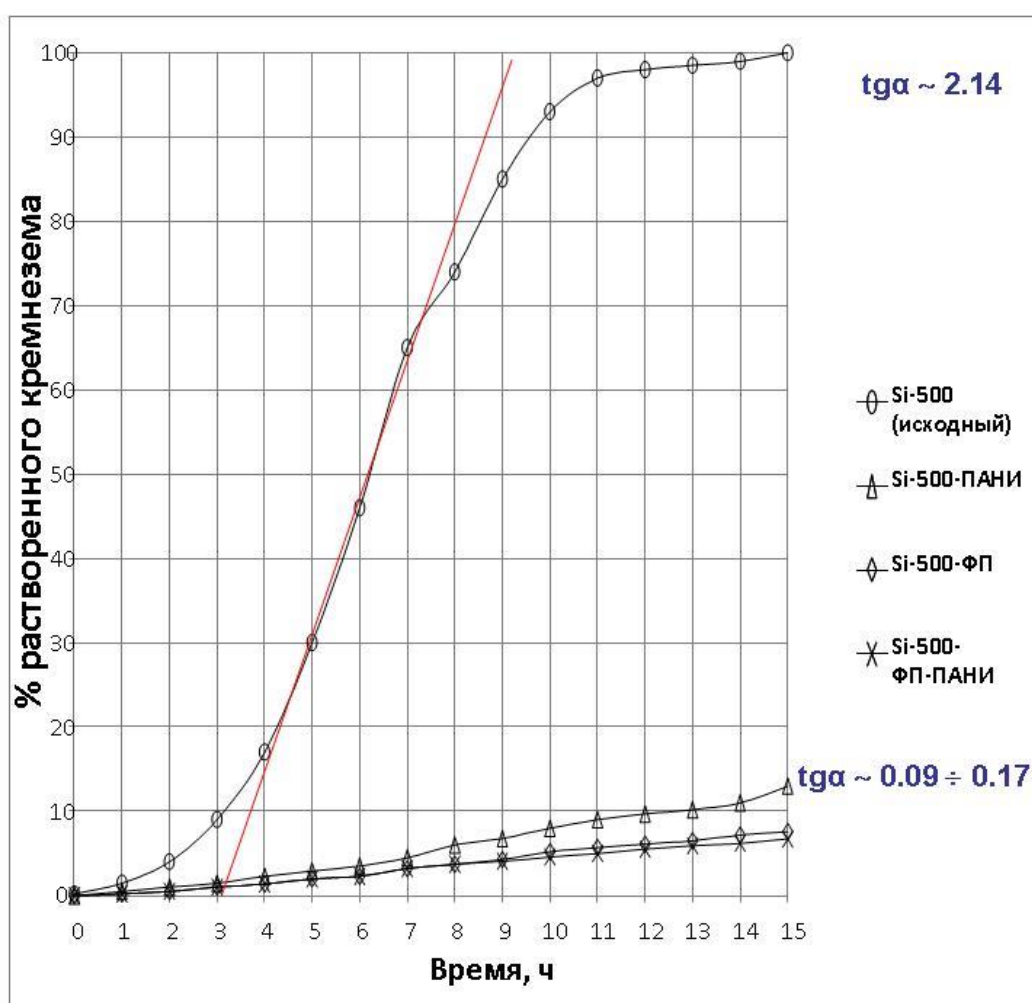


Рисунок 4.36 – Экспериментальное определение гидролитической стабильности некоторых полученных сорбентов в 0.01 М NaOH (pH = 12.0).

Таблица 4.5 - Характеристики полимерных покрытий в образцах полученных композитов*.

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

*Структуры полимерных модификаторов представлены на Рисунке 3.4.

** Слои на поверхности носителя сформированы в результате многократного нанесения полимеров из их растворов.

Таким образом, разработанные технологические приемы позволили получать фторполимер- и ПАНИ-содержащие композиты с сохранением пористости исходного носителя (т. е. материалы с высокой сорбционной емкостью) с равномерно распределенным по поверхности носителя полимерным покрытием. Такая структура сорбентов, как будет показано ниже, обеспечивает низкий уровень неспецифической сорбции за счет экранирования материала носителя сплошным полимерным нанопокрывтием.

ГЛАВА 5. ПРИМЕНЕНИЕ ФП- И ПАНИ-СОДЕРЖАЩИХ КОМПОЗИТОВ В СОСТАВЕ РАЗРАБОТАННЫХ БИОСЕПАРИРУЮЩИХ ЭЛЕМЕНТОВ

Основная задача предпринятого исследования, сформулированная в Главе 4 диссертации, заключается в разработке технологических способов получения полимерсодержащих композитов, в результате использования которых реализуется эффект «*негативной селекции*» в отношении НК. В этой главе также обсуждался выбор носителей, наиболее подходящих для получения таких композитов. Результаты экспериментов, описанные в Главе 4, подтвердили сделанное нами ранее предположение о том, что сорбционные свойства, демонстрируемые в отношении НК и белков фторполимерами и ПАНИ, в определенной степени присущи также некоторым другим классам полимеров. В частности, было показано, что подобными свойствами обладают полиарамиды, имеющие в составе макромолекулы фторсодержащие группы и/или ароматический азот. В результате сравнительного анализа свойств ФП-, ПАНИ-содержащих композитов и таких полиарамидов было показано, что сорбционные свойства исследованных материалов определяются суммарным вкладом различных механизмов сорбции, происходящей в результате гидрофобных взаимодействий, ионных взаимодействий и образования водородных связей.

В Главе 5 будут рассмотрены результаты тестирования и практического применения полученных ФП- и ПАНИ-содержащих материалов в молекулярной диагностике. В первой части Главы 5 будет дан сравнительный анализ разработанных протоколов пробоподготовки НК-содержащих образцов с использованием полученных сорбентов для одностадийного выделения препаратов НК, непосредственно пригодных для последующего ПЦР-анализа. Во второй части Главы 5 будут рассмотрены результаты применения разработанных композитов в некоторых других областях (таких как медицинская биоаналитика и твердофазный синтез олигонуклеотидов).

Одностадийное выделение НК проводили из образцов, различающихся источником НК (вирусы и клеточные организмы), способом получения (специально приготовленные растворы или смеси, лизаты культур бактериальных клеток, тканей организмов, биологических жидкостей, проб пищевых продуктов, воздуха, воды, почвы), составом и содержанием ингибиторов *Taq*-полимеразы. Краткая классификация использованных образцов для наглядности представлена в Таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Классификация использованных в исследовании НК-содержащих образцов.

1. Источник НК		
биологическая форма (<i>вирусы, бактерии, простейшие, грибы, растения, животные, человек</i>)		модельный раствор (смесь)
2. Происхождение образца		
искусственные (<i>модельные смеси биополимеров, выращенные культуры клеток</i>)	природные (<i>ткани и биологические жидкости, пробы воды, воздуха или почвы</i>)	пищевые продукты
3. Состав образца		
простой		сложный
<i>растворы (смеси) биополимеров</i>	<i>бактериальные культуры, мазки, пробы слюны и др.</i>	<i>образцы растительной ткани, кровь, экстракты почвы, а также модельные образцы со специально внесенными добавками</i>
4. Источник пробы		
эталонные растворы (смеси), культуры клеток, ткани организмов, биологические жидкости, пробы воды, воздуха или почвы, пищевые продукты		
5. Содержание ингибиторов полимеразы		
низкое (<i>как правило, образцы простого состава</i>)		высокое (<i>образцы тканей растений, крови и почвы, специально приготовленные модельные смеси</i>)

Глядя на Таблицу 5.1, легко заметить, что общей характеристикой для любого образца является описание биологической формы - источника НК (из чего, как правило, становится ясно, с какой целью НК выделяется), а все прочие характеристики являются, скорее, производными и указывают на способ получения и подготовки образца. Поэтому в Главе 5 дано последовательное изложение результатов одностадийного выделения НК из каждого указанного в Таблице 5.1 источника НК с использованием различных БЭ.

Разработанная линейка БЭ включает сорбенты, полученные на базе различных твердых матриц (дисперсные носители, синтетические мембраны, стеклянные мультикапилляры), что позволяет выбирать наиболее подходящие варианты для эффективного выделения целевого биополимера из конкретного биологического объекта. Варианты БЭ, запатентованных в ходе проведенных исследований сорбенты, представлены на Рисунке 5.1.

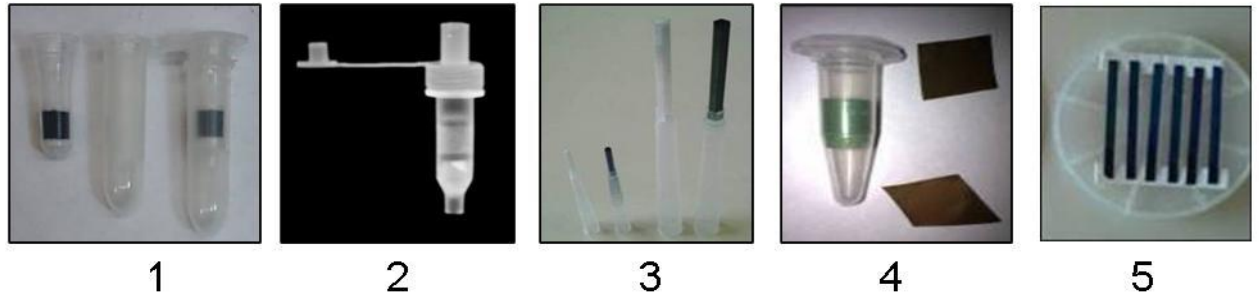


Рисунок 5.1 - Примеры разработанных БЭ. 1 - спин-картриджи с ПАНИ-сорбентом; 2 - двухслойная концентрирующая спин-колонка (верхний очищающий слой – ФП-сорбент, нижний концентрирующий слой – гранулы сшитого полиакриламида, поглощающие влагу); 3 - стеклянные мультикапилляры, покрытые нанослоем ПАНИ, впаянные в наконечник для механического дозатора; 4 - ПАНИ-модифицированная мембрана ММК-2, особым образом вставленная в картридж; 5 - кремниевые пластины, модифицированные сополимерами анилина с 3-АБК, для масс-спектрометрии.

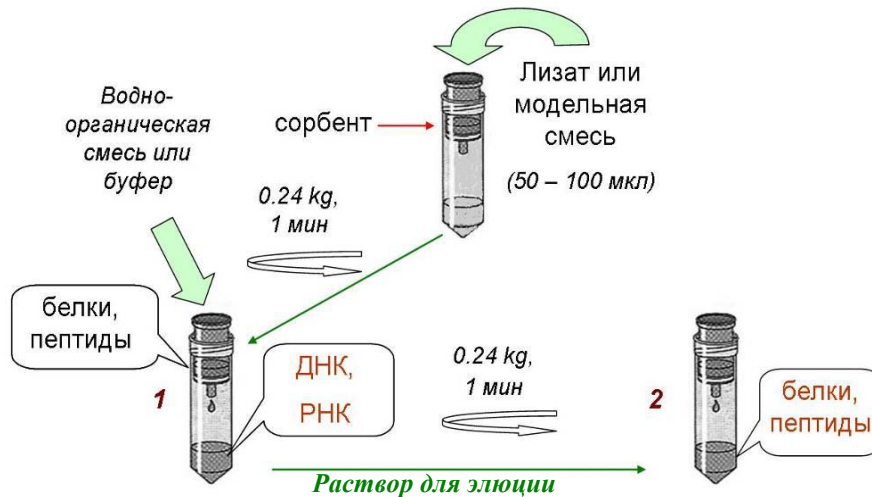


Рисунок 5.2 - Схема одностадийного выделения НК и (при необходимости) последующего выделения белков (пептидов) с помощью разработанных ФП- и ПАНИ-содержащих сорбентов.

Благодаря открытию эффекта «*негативной селекции*» в отношении НК, который демонстрируют некоторые полимеры и содержащие их композиты, удалось реализовать важное преимущество по сравнению с ранее известными сорбентами. Это преимущество заключается в возможности выделения НК из биологических смесей сложного состава в одну стадию. Схема одностадийного выделения НК, использованного в настоящем исследовании, представлена на Рисунке 5.2.

5.1. Применение разработанных биосепарирующих элементов в пробоподготовке для проведения ПЦР-анализа

5.1.1. Одностадийное выделение ДНК (РНК) из бактерий (включая микобактерии и микоплазмы) и одноклеточных грибов

Если при исследовании механизмов сорбции биополимеров на полученных полимерных покрытиях использовали «простые» образцы (растворы биополимеров, их смеси и лизаты выращенных бактериальных культур), то при разработке оптимальных протоколов одностадийного выделения НК из реальных биологических смесей наряду с «простыми» образцами исследовали образцы «сложного состава» (см. Таблицу 5.1). Поскольку в начале исследования условия выделения НК отрабатывались на образцах, содержащих бактерии, обсуждение полученных результатов логично начать с примеров выделения бактериальной ДНК (РНК).

Разработанные в результате проведенного исследования протоколы лизиса образцов детально описаны в Главе 2 диссертации. В некоторых случаях (например, при выделении НК из образцов, обогащенных ингибиторами полимеразы) возникала необходимость вносить определенные (иногда существенные) изменения в описанные протоколы. Соответствующие изменения, предпосылки к ним и полученные результаты обсуждаются в Главе 5.

Представлялось важным показать, что практическое использование разработанных БЭ не только обеспечивает возможность одностадийного выделения НК в принципе, но также оказывается более эффективным по сравнению с известными ранее многостадийными методами выделения. С этой целью НК выделяли не только непосредственно из бактериальных культур, но также из содержащих бактерии образцов, полученных на основе пищевых продуктов и некоторых косметических препаратов, а также из образцов, обогащенных ингибиторами полимеразы (при выделении из плазмы крови, из цельной крови, из растительных тканей, экстрактов почвы и др.). Параллельно оценивали эффективность применения картриджного варианта выделения и «*batch*»-метода. Сравнивали выход и чистоту НК в элюатах, полученных с помощью разработанных БЭ и с использованием коммерческих наборов, обеспечивающих многостадийную процедуру выделения, а также полученных методом фенол-хлороформной экстракции. Выделение НК во всех указанных случаях проводили из одинаковых образцов.

ДНК выделяли из грамположительных и из грамотрицательных бактерий. Грамположительные бактерии (принадлежащие к родам *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium* и ко многим другим, в том числе не имеющим клеточной стенки) окрашиваются красителем кристаллическим фиолетовым (в результате обработки методом, разработанным Грамом [386]), и сохраняют окраску после промывания спиртом, в отличие от грамотрицательных бактерий. Последние, как правило, имеют две (внутреннюю и внешнюю) клеточные мембраны и характеризуются более сложным строением, чем грамположительные бактерии. Наличие двух мембран защищает бактериальную клетку от воздействия молекул красителей, ПАВ и антибиотиков. Эти организмы часто вызывают серьезные патологии человека и животных. К грамотрицательным бактериям относятся протеобактерии, включая, например, представителей родов *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Proteus*, *Moraxella*, *Helicobacter* и множество других (например, цианобактерии, спирохеты, кокки, вызывающие гонорею и менингит, агробактерии и пр.). Другими объектами исследования являлись образцы биоматериала, содержащие некоторые патогенные дрожжевые организмы, аксомицеты, микобактерии туберкулезного комплекса и простейшие.

Полученные результаты проиллюстрированы рядом примеров.

С целью демонстрации основного преимущества (быстрое одностадийное выделение высокоочищенной ДНК), достигаемого благодаря применению ФП-сорбентов по сравнению с многостадийными процедурами, на картриджи с Trisoror™-500-ПТФЭ-сорбентом наносили лизаты бактериальных культур грамположительных и грамотрицательных бактерий (10^9 клеток/мл). Выход ДНК в полученных элюатах оценивали по результатам электрофореза в агарозном геле (Рисунок 5.3). На гель наносили элюаты, полученные из одних и тех же лизатов с помощью ПТФЭ-содержащего сорбента и в результате выделения с применением многостадийного протокола с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit компании Qiagen (Германия).

Очевидно, что элюаты, полученные в результате проведения многостадийной процедуры с использованием набора от Qiagen, содержат значительно меньше ДНК, чем после одностадийного выделения с применением картриджей с ПТФЭ-сорбентом. Во всех случаях дорожки, относящиеся к РНК, на электрофореграмме отсутствовали, поскольку в лизирующую смесь добавляли РНКазу.

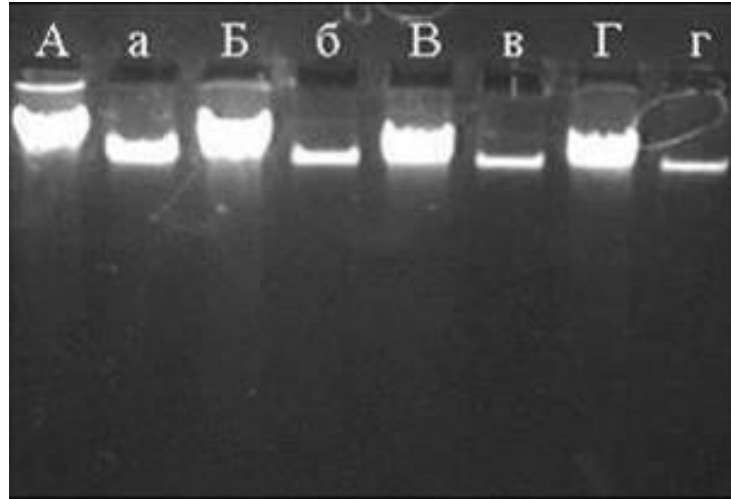


Рисунок 5.3 - Электрофорез в 0.8 % агарозном геле элюатов, полученных после выделения ДНК из бактериальных культур с помощью ПТФЭ-сорбента (А – Г) и набора QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen (а – г). А/а – *Escherichia coli*; Б/б – *Bacillus subtilis*; В/в – *Listeria monocytogenes*; Г/г – *Staphylococcus aureus* [352].

Результаты электрофореза образцов ДНК в агарозном геле, представленные на Рисунках 5.4 и далее, доказывают, что эффект «*негативной селекции*» в отношении ДНК демонстрируют не только материалы, содержащие перфторированный полимер (ПТФЭ-сорбенты), но также сорбенты, содержащие частично фторированные полимерные покрытия (ПФБД-сорбент). В последнем случае наибольший выход выделяемой ДНК был достигнут при использовании сорбента на основе носителя, имеющего средний диаметр пор 50 нм (500 Å), поэтому в последующих экспериментах, как правило, применяли сорбенты, полученные на основе кремнеземных носителей, характеризующихся аналогичной или близкой пористостью.

Благодаря использованию ПФБД-содержащих сорбентов удалось не только значительно уменьшить потери выделяемой ДНК, но также до 3 – 5 мин сократить время, затрачиваемое на проведение процедуры выделения. Это важный показатель, поскольку при выделении ДНК по многостадийному протоколу с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit, например, требуется, в среднем, 30 мин. Эффект «*негативной селекции*» в отношении ДНК отчетливо проявляется при сравнении результатов выделения ДНК из различных бактериальных культур с помощью мини-картриджей с ПФБД-сорбентом и с помощью упомянутого набора компании Qiagen (Рисунок 5.5).



Рисунок 5.4 - Электрофореграмма элюатов, полученных при выделении ДНК из *E. coli* с использованием картриджей с ПФБД-содержащими сорбентами, синтезированными на основе кремнезёмов с различной пористостью: М – ДНК-маркер, 1 – Trisoror™-500-ПФБД; 2 – МПС-250ГХ-ПФБД; 3- МПС-1150ГХ-ПФБД; 4 - МПС-2000ГХ-ПФБД (цифры, проставленные в марках носителей, обозначают средний диаметр пор носителя в ангстремах) [137].

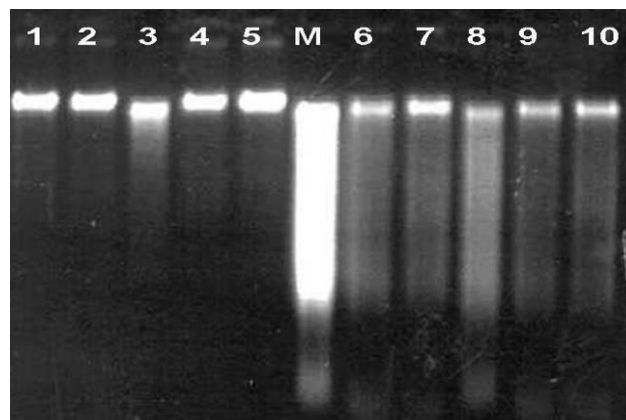


Рисунок 5.5 - Электрофореграмма в 1 % агарозном геле элюатов, полученных при одностадийном выделении бактериальной ДНК с помощью картриджей с сорбентом GPB-Trisoror™-500-ПФБД (1 - 5) и с помощью картриджей QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen (6 - 10): М - маркерная смесь (сконцентрированная в 2 раза смесь всех полученных элюатов); 1, 6 - *E. coli*; 2, 7 - *Proteus vulgaris*; 3, 8 - *Salmonella typhimurium*; 4, 9 - *Bacillus subtilis*; 5, 10 - *Staphilococcus aureus*.

Высокая емкость ПФБД-сорбента в отношении белков позволила проводить эффективное выделение бактериальной ДНК после нанесения лизата на сухой слой сорбента, что, как следует из Рисунка 5.5, не приводило к уменьшению выхода выделяемой ДНК. На этом рисунке также видно, что при использовании ПФБД-сорбента выделяется высокомолекулярная ДНК, в то время как ДНК в составе

элюатов, получаемых с применением колонок компании Qiagen, расщеплена (по-видимому, вследствие многостадийности процедуры выделения). Особенно много фрагментов ДНК наблюдали в элюатах при выделении из культур грамотрицательных бактерий (*Salmonella*, *Escherihia* и *Proteus*). Помимо фрагментов ДНК в этих элюатах присутствовали примеси РНК. При выделении с помощью ПФБД-сорбента РНК, в основном, удерживалась.

Эффективность применения картриджей с ФП-содержащими сорбентами (в частности, с ПФБД-сорбентами) для удерживания суммарной белковой фракции, присутствующей в образцах, предназначенных для выделения ДНК, подтверждена экспериментально. На рисунке Рисунке 5.6 представлена ПААГ-электрофореграмма элюатов, полученных после пропускания через картриджи с ПФБД-сорбентами лизата культуры *E. coli*, а также лизата смеси бактериальной культуры с молочным порошком.

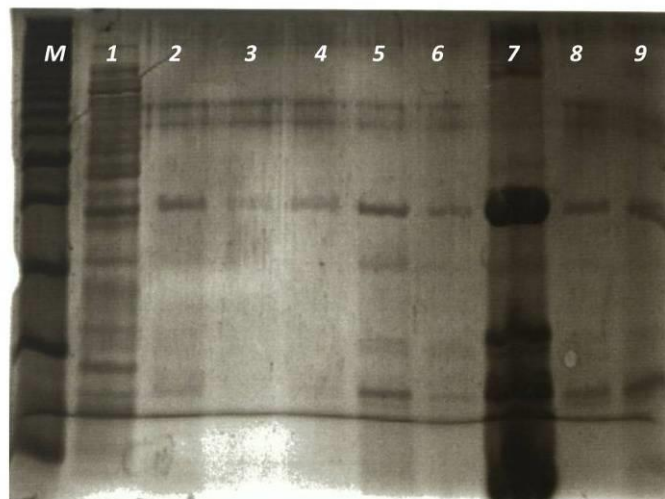


Рисунок 5.6 – Результаты электрофореза в градиентном ПААГ (окрашивание по Брэдфорду [387]. М - смесь белков: лизоцим (12 кДа), β-лактоглобулин (19 кДа), карбоангидраза (28 кДа), овальбумин (45 кДа), БСА (68 кДа), фосфорилаза В (107 кДа), миозин, Н-цепь (208 кДа). 1 – культура *E. coli*; 2 - 6 - элюаты, полученные после нанесения лизатов культуры *E. coli* на картридж с ПФБД-сорбентом; 7 - смесь лизата культуры *E. coli*, предварительного смешанной с молочным порошком (Uelzena EG, Германия); 8 - 9 - элюаты, полученные после нанесения лизатов смеси бактериальной культуры с молочным порошком на картридж с Trisorp™-500-ПФБД-сорбентом.

Из Рисунка 5.6 следует, что ПФБД-сорбент эффективно удерживает как большую часть высокомолекулярных белков, так и белки с относительно низкой массой не только из бактериального лизата, но также из образца, в который добавляли молочный порошок. Это Свойство ПФБД-содержащего материала эффективно удерживать белки проявляется при выделении ДНК из лизатов грамотрицательных и

грамположительных бактерий, что продемонстрировано электрофореграммой на Рисунке 5.7.

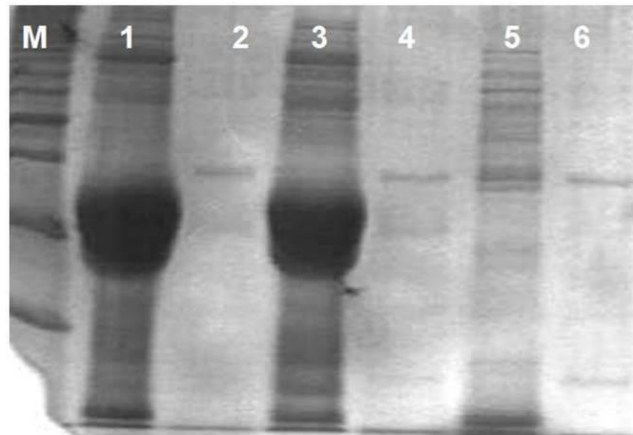


Рисунок 5.7 – Результат ПААГ-электрофореза элюатов, полученных после выделения бактериальных ДНК с помощью картриджей с Trisoror™-500-ПФБД-сорбентом: M – маркер, 1 – культура *E. coli*, 3 – культура *Listeria monocytogenes*, 5 – культура *Proteus vulgaris*; 2, 4, 6 – элюаты, содержащие ДНК, очищенную от белков.

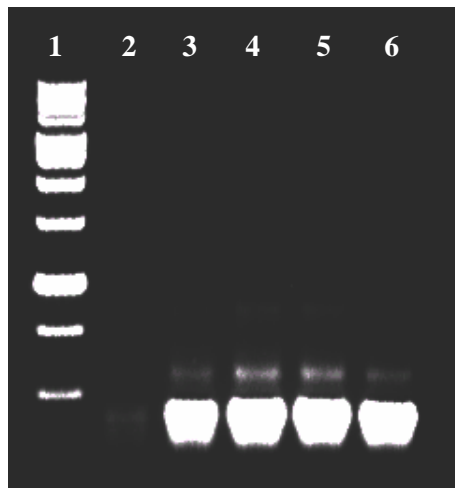


Рисунок 5.8 – Результаты электрофореза в 1 % агарозном геле ПЦР-фрагментов, полученных при использовании ДНК, выделенной из лизатов клеток *E. coli* с помощью картриджей с сорбентом Trisoror™-500-ПФБД (3 – 4) и ПТФЭ-модифицированным сорбентом на основе того же носителя (5 – 6), соответственно. 1 – ДНК маркер; 2 – отрицательный контроль (вода) [355].

Высокая степень очистки выделяемой ДНК от ингибирующих ПЦР примесей подтверждается результатами ПЦР. На Рисунке 5.8 хорошо видны ПЦР-фрагменты, полученные в результате проведения ПЦР с использованием бактериальной ДНК, выделенной на картриджах, содержащих ПТФЭ-сорбент, взятый для сравнения (дорожки 5, 6), и картриджей, содержащих ПФБД-сорбент (дорожки 3, 4).

Ниже приведены примеры, подтверждающие, что с помощью линейки разработанных сорбентов удается в одну стадию выделять чистые препараты ДНК, пригодные для непосредственного проведения ПЦР-анализа, с целью решения разнообразных диагностических задач.



Рисунок 5.9 – Электрофореграмма (0.8 % агарозный гель) ПЦР-фрагментов элюатов, полученных с использованием ПФБД-сорбента. М - ДНК-маркер; ДНК для проведения ПЦР-анализа выделяли из следующих образцов: 1, 2 – лизат *Proteus vulgaris*, картриджный метод выделения; 3, 4 - тот же лизат, выделение «batch»-методом с частицами Trisopor™-500-ПФБД; 5 - лизат смеси культуры *P. vulgaris* с гелем для душа Nivea, картриджный метод; 6 - лизат смеси культуры *P. vulgaris* с гелем для душа Nivea, «batch»-метод; 7 - лизат смеси культуры *P. vulgaris* с кремом Nivea, картриджный метод; 8 - тот же лизат, «batch»-метод; 9 - лизат *P. vulgaris* с БСА, картриджный метод; 10 - лизат *P. vulgaris* с БСА, «batch»-метод; 11 - лизат смеси культуры *P. vulgaris* с гелем для душа Nivea с добавлением БСА, картриджный метод; 12 - тот же лизат, «batch»-метод; 13 - лизат смеси культуры *P. vulgaris* с кремом Nivea с добавлением БСА, картриджный метод. 14 - лизат смеси культуры *P. vulgaris* с йогуртом Ehrmann, картриджный метод; 15 – тот же лизат, «batch»-метод.

На Рисунке 5.9 изображена электрофореграмма ПЦР-фрагментов, полученных в результате проведения ПЦР элюатов, собранных после пропускания лизатов сложного состава через картриджи с ПФБД-сорбентом. Проводили ферментативный лизис культуры *Proteus vulgaris* и смесей, полученных после добавления указанных бактериальных клеток к некоторым косметическим средствам (гель для душа и крем) и к йогурту. Лизис проводили с добавлением максатазы (протеиназа из *B. licheniformis*, иммобилизованная в растворимых гранулах полиэтиленгликоля). Дополнительно оценивали эффективность выделения ДНК из указанных образцов, в которые перед лизисом добавляли БСА.

Отсутствие ПЦР-фрагментов в некоторых элюатах (треки 6, 8 и 15) можно объяснить содержанием в соответствующих образцах (косметические средства и молочный йогурт) значительного количества веществ-консервантов (кислоты, этанол

и др.), являющихся ингибиторами *Taq*-полимеразы. В картриджном варианте выделения ДНК в результате статической сорбции удается эффективно удерживать указанные низкомолекулярные примеси (в частности, за счет их диффузии в поры сорбента при инкубировании). Аналогичного количества частиц сорбента в интенсивно перемешиваемом объеме при проведении «*batch*»-процесса (с учетом затрачиваемого на очистку ДНК времени – от 1 до 3 мин) недостаточно для удерживания указанных примесей, что приводит к их присутствию в надосадочной жидкости и, следовательно, к ингибированию ПЦР.

Аналогичные результаты были получены при использовании ПАНИ-содержащих сорбентов на основе того же кремнеземного носителя. Электрофореграмма образцов выделенной из лизата *E. coli* ДНК представлена на Рисунке 5.10. Содержание ДНК в элюате, полученном при использовании ПАНИ-содержащего сорбента (дорожка 2), незначительно отличается от содержания ДНК в исходном лизате (дорожка 1) и в элюате, полученном при использовании ПФБД-содержащего сорбента (дорожка 4). Однако, содержание ДНК в элюате, полученном после многостадийной процедуры выделения с помощью картриджа фирмы Qiagen, заметно ниже (дорожка 3).

Так же, как в случае использования ФП-содержащих сорбентов, применение ПАНИ-модифицированных кремнеземов позволяет получать очищенные препараты ДНК, пригодные для непосредственного проведения ПЦР-анализа. Ампликоны, полученные в результате ПЦР с использованием бактериальной ДНК, выделенной с помощью картриджей с ПАНИ-содержащим сорбентом и с сорбентом, модифицированным ПФБД, хорошо видны на Рисунке 5.11 (дорожки 2 – 3 и 4 – 5, соответственно).

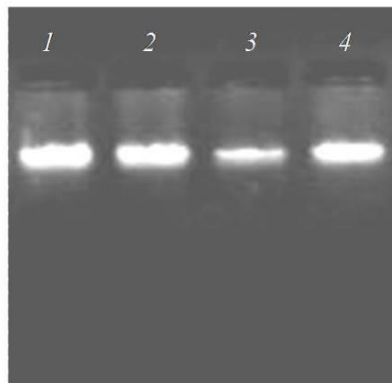


Рисунок 5.10 – Электрофореграмма образцов ДНК из *E. coli* в 1 % агарозном геле, выделенных различными методами: 2 - с использованием ПАНИ-модифицированного сорбента; 3 - с использованием коммерческого набора фирмы Qiagen; 4 – с использованием ПФБД-модифицированного сорбента; 1 – исходный лизат [354].

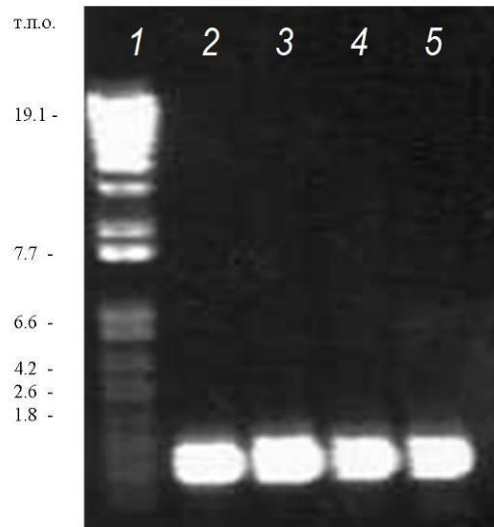


Рисунок 5.11 - Сравнение эффективности ПЦР при использовании образцов ДНК из лизатов клеток *E. coli*, полученных при выделенных с помощью картриджей, упакованных ПАНИ-модифицированным сорбентом на основе макропористого стекла Trisoror™-500 (дорожки 2 – 3) и ПФБД-модифицированным сорбентом на основе того же носителя (дорожки 4 – 5, соответственно); 1 – ДНК маркер (19.1, 7.7, 6.6, 4.2, 2.6, 1.8 т. п. о.) [354].

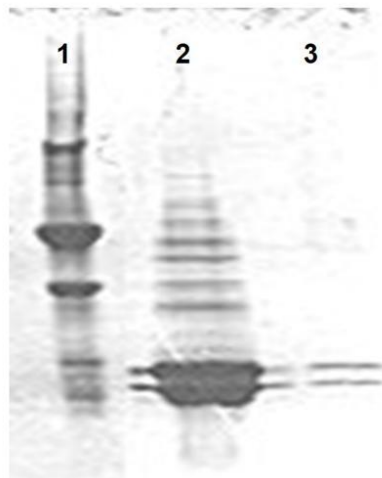


Рисунок 5.12 - ПААГ-электрофореграмма лизата *E. coli* до и после нанесения на картридж, содержащий МПС-1150-ПАНИ-сорбент: 1 – белковая смесь (220, 67, 36, 18.5 кДа); 2 – лизат *E. coli* до очистки на сорбенте; 3 – элюат, полученный после выделения ДНК [355].

Из анализа ПААГ-электрофореграммы на Рисунке 5.12 следует, что ПАНИ-содержащий сорбент удерживает практически всю высокомолекулярную белковую фракцию, а в элюате остается незначительное количество низкомолекулярных белков. Этот результат согласуется с данными, полученными при исследовании механизма сорбции биополимеров на поверхности ФП- и ПАНИ-материалов, которые обсуждались в Главе 3 диссертации. По-видимому, не удерживаемые ПАНИ-

сорбентом белки отличаются низкими значениями pI и не сорбируются в условиях, оптимальных для одностадийного выделения ДНК (нейтральная или слабощелочная среда).

Таблица 5.2 – Суммарное содержание белка в исходном лизате культуры *E. coli* и в элюате, полученном в результате выделения ДНК с помощью МПС-1150ГХ-ПАНИ-сорбента [354]. Численные значения представлены как $\pm SD$, $n = 3$.

Образец (60 мкл)	Содержание белка в пробе по Бредфорду [388], мкг/мл	Суммарное количество белка в пробе, мкг	Содержание белка в пробе, %
лизат	302 ± 0.5	18.12 ± 0.3	100
элюат	42.2 ± 6.0	2.5 ± 0.4	14 ± 2.0

В Таблице 5.2 приведено экспериментально определенное содержание белков в исходных бактериальных лизатах и в элюатах, полученных при использовании МПС-1150ГХ-ПАНИ-сорбента. Из этих данных следует, что ПАНИ-сорбент удерживает 85 % суммарной белковой фракции, присутствующей в исходном лизате. До определенного предела количество не удерживаемых белков (в абсолютном значении) может быть снижено в результате одновременного увеличения массы сорбента в составе картриджа и уменьшения объема наносимого лизата. В ряде случаев желаемый результат (максимальное удерживание белковой фракции) достигается разбавлением пробы перед нанесением на картридж. Однако следует принимать во внимание, что разбавление наносимой пробы не должно приводить к уменьшению абсолютного содержания в ней выделяемой ДНК более чем в 2 раза по сравнению с содержанием ДНК в исходном образце, во избежание заметного снижения чувствительности ПЦР-анализа.

Интересно отметить, что при выделении ДНК из *E. coli* с помощью Si-500-ПС-SO₃-ПАНИ-кремнезема и кремнезема, модифицированного Si-500-изо-ПСК-ПАНИ, по данным спектрофотометрии установлено, что белки сорбируются на изо-ПСК-ПАНИ-содержащем сорбенте эффективнее, чем на ПС-SO₃-ПАНИ-содержащем сорбенте. Выход ДНК возрастал пропорционально содержанию протонированных сульфогрупп в комплексе ПСК-ПАНИ, а удерживание белка достигало 99.5 %.

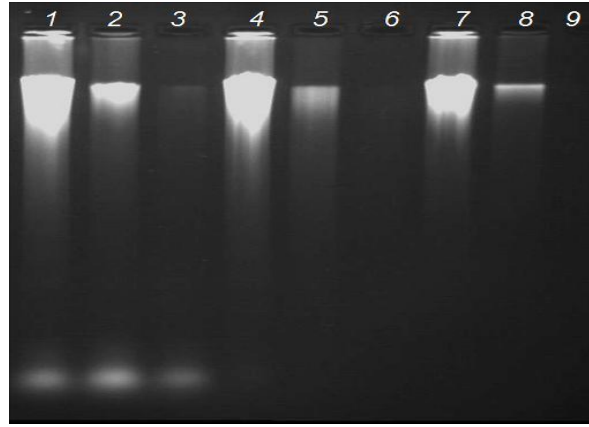


Рисунок 5.13 - Результаты электрофореза в 0.8 % агарозном геле смеси ДНК и РНК и элюатов, полученных после пропускания смеси через картриджи с ПАНИ-содержащими сорбентами. 1 – 3 – исходная смесь (1 – без разведения, 2 – в разведении $\frac{1}{2}$, 3 – в разведении $\frac{1}{10}$); 4 – 6 – элюаты получены при использовании Si-500-ПС-SO₃-ПАНИ; 7 – 9 – элюаты получены при использовании Si-500-NH₂-изо-ПСК-ПАНИ; 4, 7 – элюаты, полученные после пропускания через картриджи исходной смеси; 5, 8 – элюаты получены после пропускания через картриджи Трис-НСl (рН 8.0); 6 – 9 – элюаты получены после пропускания через картриджи водного раствора НСl (рН 3.0) [360].

Из Рисунка 5.13 следует, что оба исследованных ПАНИ-содержащих сорбента удерживают лишь незначительное количество ДНК, но эффективно сорбируют РНК, которую затем не удавалось десорбировать ни при нейтральном, ни при кислом значении рН элюента.

Использование ПАНИ-сорбентов, полученных с помощью альтернативных разработанных технологий (в частности, материала, полученного в результате осадительной окислительной полимеризации анилина в присутствии неактивированного кремнезема), также обеспечивает выделение очищенной бактериальной ДНК с высоким выходом. В качестве примера на Рисунке 5.14 представлена электрофореграмма ПЦР-фрагментов, полученных при использовании ДНК, выделенной с помощью картриджей с ПАНИ-сорбентами из неразбавленной клеточной культуры (10^9 клеток/мл) и из разведенной культуры (10^2 клеток/мл) грамотрицательной бактерии *Salmonella typhimurium*. Для сравнительной оценки емкости исследуемых сорбентов по отношению к белкам к некоторым образцам (дорожки 5 и 6) перед лизисом добавляли БСА.

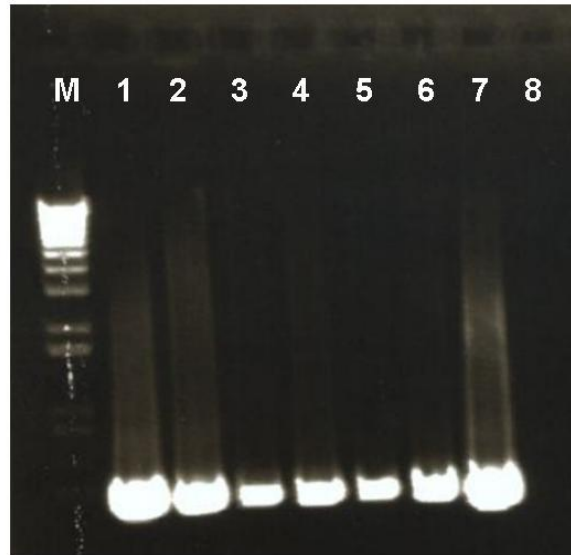


Рисунок 5.14 - Электрофореграмма ПЦР-фрагментов, полученных после экстракции ДНК из *S. thyphimurium*. 1, 2 – выделение ДНК проводили из лизата неразведенной культуры (10^9 клеток/мл); 3, 4 - выделение проводили из лизата разведенной культуры (10^2 клеток/мл); 5, 6 - выделение проводили из лизата неразведенной культуры с добавлением БСА. Нечетные номера – выделение с помощью картриджей с МПС-1150ГХ-ПФБД-сорбентом, четные номера – выделение с помощью картриджей с Si-500-ПАНИ-сорбентом; 7 – положительный контроль (в ПЦР брали ДНК, выделенную из *S. Thyphimurium*); 8 – отрицательный контроль (вода).

Оказалось, что даже после внесения в образцы БСА происходила эффективная амплификация фрагментов выделенной бактериальной ДНК.

При выделении ДНК из образцов, загрязненных почвенной пылью, или из бактериальных спор использовали двухкомпонентные картриджи, содержащие помимо слоя сорбента (кремнезем, модифицированный фторопластом 42Л) дополнительный слой полиакриламидных частиц (Biogel P-10, Bio-Rad, США), выступающих в качестве «молекулярного насоса». После нанесения пробы лизата на картридж при контакте пробы со слоем сухого «Биогеля» во время инкубирования картриджа перед центрифугированием происходило впитывание значительного объема жидкости, содержащей низкомолекулярные компоненты (прежде всего, соли) в поры частиц геля. Более крупные молекулы биополимеров слоем геля не удерживались. Принципиальным моментом в этом протоколе является использование сухих частиц еще ненабухшего геля, помещаемых в картридж (спин-колонку) между двумя нижними фильтрами таким образом, чтобы обеспечить достаточный объем для набухающего в процессе выделения ДНК геля.

Анализируемую пробу, предназначенную для ПЦР-идентификации вегетативных форм бактерий, риккетсий и вирусов, и содержащую микроорганизмы в концентрации $10^3 - 10^5$ КОЕ (БОЕ)·мл⁻¹, подвергали термодеструкции (т. е. проводили термический лизис без добавления протеолитических ферментов при 98°C в течение 5 мин). 200 мкл полученного лизата наносили на верхний фильтр БЭ (Рисунок 5.15).

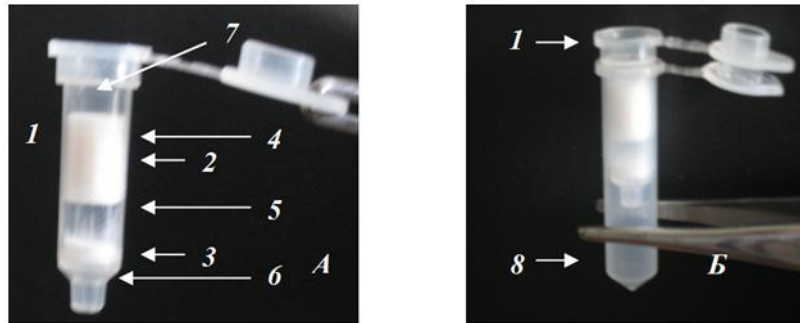


Рисунок 5.15 – Двуслойный биосепарирующий элемент, содержащий ФП-сорбент и концентрирующий слой. А – без пробосборника; Б – биосепарирующий элемент, вставленный в сборник: 1 – пластиковый картридж; 2 – слой композиционного фторполимерсодержащего сорбента; 3 – слой биогеля; 4 – верхний фильтр; 5 – межслойный фильтр; 6 – нижний фильтр; 7 – горловина биосепарирующего элемента; 8 – пробосборник.

Выделение (биосепарация) ДНК с помощью разработанного БЭ может быть проведено различными способами. Во-первых, для продавливания нанесенного образца через слой композиционного ФП-сорбента и слой гранул сшитого полимерного геля можно использовать центрифугу. В этом случае необходимо предварительно эмпирически определить скорость и продолжительность вращения центрифуги в зависимости от объема и вязкости лизата, чтобы обеспечить требуемый режим набухания «Биогеля».

Во-вторых, процедуру выделения ДНК можно проводить, создавая избыточное давление с помощью перистальтического насоса. В этом случае пробу следует продавливать через слои сорбентов в составе БЭ с помощью воздушного пузыря, предварительно созданного в шланге, выведенном из насоса и подсоединенном к БЭ. Продавливание пробы осуществляется за счет подачи воды из предусмотренной для этого емкости. С целью предохранения БЭ от попадания воды, содержащейся в шланге перистальтического насоса, предприняты специальные меры, описанные в Главе 2.



Рисунок 5.16 – Установка для биосепарации с помощью перистальтического насоса. 1 – перистальтический насос; 2 – шприц для удаления жидкости из подающего шланга; 3 – гибкий патрубок для присоединения БЭ; 4 – сосуд с водой; 5 – БЭ, вставленный в пробосборник.

БЭ вставляли в сборник, наносили лизат и присоединяли БЭ к линии перистальтического насоса (Рисунок 5.16). Выделение ДНК на такой установке проводили в три этапа: сначала создавали условия для пропитки лизатом слоя ФП-содержащего сорбента (слой 2, Рисунок 5.15); затем смачивали слой «Биогеля» (слой 3, Рисунок 5.15), после чего на систему не оказывали внешнего влияния в течение 1 мин. Наконец, на третьем этапе включали насос, обеспечивая максимальный расход нагнетающей жидкости (до 10 мл/мин). Полученный после биосепарации элюат использовали в ПЦР.

В экспериментах с применением описанного устройства выделяли ДНК из образцов, содержащих вегетативную и споровую формы бактерии *Bacillus cereus* (которая в результате употребления некачественной пищи нередко вызывает токсикоинфекции, сопровождающиеся рвотным и диарейным синдромами). Перед лизисом в образцы добавляли частицы фага λ , чтобы обеспечить дополнительный контроль над протеканием ПЦР, поскольку в процессе термического лизиса высвобождение ДНК из частиц бактериофага λ протекает значительно легче, чем из спорных форм бактерий.

Программа амплификации:

1. 94,0 °C - 04:00
 2. 94,0 °C - 00:30
 - 57,3 °C - 00:30
 - 71,0 °C - 00:15
 - 71,0 °C - 00:15
 3. 10,0 °C - хранение
- } *30

Зависимость флуоресценции канала FAM от номера цикла

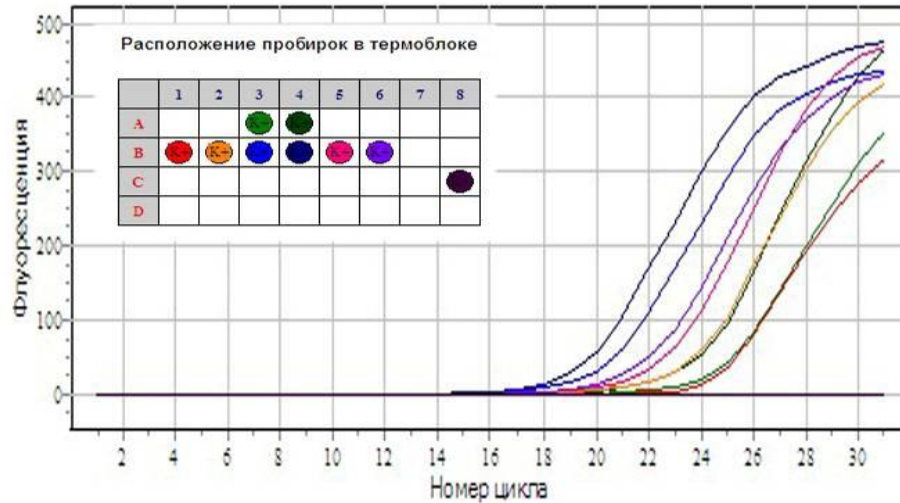


Рисунок 5.17 – Результаты ПЦР в реальном времени элюатов, полученных в результате использования двухслойного БЭ, содержащего ФП-сорбент, с целью одностадийного выделения ДНК и очистки образцов от почвенной пыли. Пробы содержали микроорганизмы в следующих концентрациях (в 1 мл): вегетативные клетки *Bacillus cereus* - $5 \cdot 10^3$, фаг λ - $6 \cdot 10^3$. Расшифровка обозначений проб: А3 – результат пробоподготовки образца, содержащего вегетативные клетки *Bacillus cereus* без пыли, без использования БЭ; В3 – то же, с использованием БЭ; В1 – то же, без использования БЭ, проба содержала пыль (ОП⁶⁰⁰=0.4); В2 – то же, после использования БЭ, проба содержала пыль (ОП⁶⁰⁰=0.2); А4 – пробоподготовка образца, содержащего фаг λ без пыли и без применения БЭ; В4 – то же с использованием БЭ; В5 – результат пробоподготовки образца, содержащего фаг λ и почвенную пыль (ОП⁶⁰⁰=0.2) после использования БЭ; В6 – то же, проба содержала пыль (ОП⁶⁰⁰=0.4); С8 – отрицательный контроль (вода).

Таким образом, из лизатов, полученных в результате термической обработки образцов, с помощью разработанных двухслойных БЭ одновременно выделяли бактериальную и вирусную ДНК. Для оценки эффективности выделения ДНК из образцов сложного состава с использованием разработанных БЭ перед выделением в часть исследуемых проб дополнительно вносили почвенную пыль (содержащую гуминовые вещества, являющиеся мощными ингибиторами полимеразы). Сравнивали профили накопления ПЦР-фрагментов при проведении ПЦР в реальном времени с элюатами, полученными с использованием разработанных БЭ.

Результаты ПЦР в реальном времени приведены на Рисунке 5.17. При использовании проб В1, А3 и А4, полученных без использования ФП-сорбента, амплификация ДНК-фрагментов прошла неудовлетворительно. Напротив, результаты ПЦР с использованием ДНК, выделенной с помощью ФП-материала (в том числе, из образцов с дополнительно внесенными частицами почвы) позволяют утверждать, что присутствие почвенной пыли в исходной пробе не мешает проведению ПЦР, поскольку разработанный ФП-содержащий сорбент одновременно удерживает как частицы пыли, так и ингибирующие полимеразу примеси.

Для подтверждения выявленного эффекта элюаты, полученные при пропускании через БЭ образцы термически дезинтегрированных микроорганизмов *Bacillus cereus* (как вегетативную, так и споровую формы), исследовали методом лазерной корреляционной спектроскопии (ЛКС). В качестве контроля использовали элюаты, полученные при пропускании модельного раствора ДНК из тимуса теленка (0.1 мг/мл) через БЭ. Результаты оценки степени удаления частиц (имеющих размер более 0.5 мкм) из элюатов, полученных в результате биосепарации с применением ФП-содержащего БЭ, представлены в Таблице 5.3.

Во всех исследованных элюатах были обнаружены частицы с эффективным диаметром 2 – 5 нм, что соответствует размерам присутствующих в растворе макромолекул ДНК. В то же время оказалось, что в элюатах, полученных в результате выделения ДНК из дезинтегрированной пробы спорных клеток *Bacillus cereus*, кроме частиц с эффективным диаметром 2 – 5 нм присутствует незначительное количество (менее 3 %) частиц с эффективным диаметром около 0.5 мкм. Этот факт можно объяснить наличием в образце интактных бактериальных спор, слабо удерживаемых поверхностью сорбента.

Таблица 5.3 – Содержание взвешенных частиц с эффективным диаметром 1 – 10⁴ нм в пробах исследуемых элюатов, определенное методом ЛКС*.

Элюат	Содержание частиц, %			Коэффициент вариации, %
	0 – 10 нм	10 – 1000 нм	1000 – 10000 нм	
раствор ДНК из тимуса теленка	100	0	0	4.9
дезинтегрированная проба <i>B. cereus</i> (вегетативная форма)	100	0	0	4.8
дезинтегрированная проба <i>B. cereus</i> (споровая форма)	97.5	0	2.5	5.2

* Данные представлены в виде усредненных величин, \pm SD, n = 5. Исследования проводили в одинаковых условиях.

Таким образом, применение БЭ, включающего два слоя различных сорбентов (материала, не удерживающего макромолекулы ДНК и одновременно селективно сорбирующего белки, а также дополнительного материала, неспецифически удерживающего молекулы в зависимости от их размеров) одновременно обеспечивает одностадийное выделение высокоочищенной ДНК из образцов различного состава и удаление твердых примесей, размеры которых превышают 0.5 мкм.

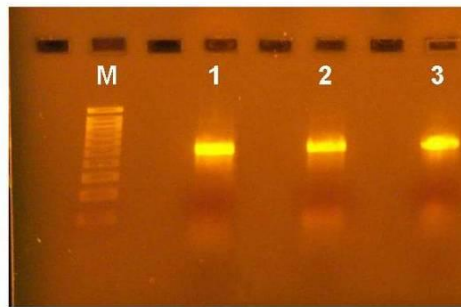


Рисунок 5.18 – Результаты ПЦР проб лизатов, содержащих ДНК, выделенную из спор *Bacillus cereus* (штамм В-771). М - маркер молекулярного веса (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1250 п.о.); 1 - ПЦР-продукт, полученный с использованием плазмидной ДНК (положительный контроль); 2, 3 – ПЦР-фрагменты, полученные в результате термической обработки спор *Bacillus cereus* (штамм В-771) и пропускания через двухслойный БЭ (исходная концентрация спор в образце - 10^7 /мл).

Результаты электрофореза, представленные на Рисунке 5.18, подтвердили, что разработанный БЭ (содержащий ФП-сорбент) пригоден для эффективного выделения ДНК не только из вегетативных форм бактерий, но также из их спор. Таким образом, ФП-содержащие материалы можно рассматривать в качестве перспективного инструмента при проведении анализа бактериального и вирусного заражения проб сточных вод, смывов с поверхности техники, фильтратов воздуха и т. д.

Данные, полученные в результате выделения ДНК с помощью разработанных БЭ из содержащих микроорганизмы модельных смесей, позволяют ожидать, что использование ФП- и ПАНИ-содержащих сорбентов существенно повысит эффективность подготовки НК-содержащих проб для клинической ПЦР-диагностики. Чтобы подтвердить данное предположение, методом ПЦР одновременно определяли присутствие в биологических образцах различных микроорганизмов, способных вызывать урогенитальные инфекции у человека: *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* и *Mycoplasma genitalium*. Для этого у десяти отобранных случайным образом пациентов производили забор урогенитальных мазков, образцы которых использовали в исследовании. Взятые образцы обрабатывали в соответствии с двумя различными

протоколами, включавшими проведение ферментативного лизиса и выделение ДНК с помощью сорбентов. Для одностадийного выделения ДНК (протокол I) использовали Si-500-ПАНИ-содержащий сорбент (на основе обработанного озоном кремнезема). В многостадийном протоколе II использовали отечественный набор Диатом™ДНК Преп 100 (ЗАО «ИзоГен»).

Из полученных лизатов выделяли ДНК, которую использовали в ПЦР. Эффективность применения протоколов I и II сравнивали, анализируя результаты электрофореза ПЦР-продуктов в агарозном геле, представленные на Рисунках 5.19 и 5.20. Можно видеть, что количество ПЦР-фрагментов, полученных после выделения ДНК по протоколу I, в некоторых случаях оказалось несколько ниже, чем после использования протокола II. Тем не менее, в обоих случаях можно с уверенностью говорить об идентичности результатов ПЦР-диагностики. Необходимо отметить, что в соответствии с протоколом I удается выделять более чистую ДНК, чем при выделении по протоколу II, что подтверждено значительно более результативной амплификацией внутреннего стандарта. Несколько более низкий выход ДНК, выделяемой в соответствии с протоколом I, является следствием существенного разбавления исходного образца лизирующим буфером (примерно в 6 раз) по сравнению с пробоподготовкой по протоколу II. С целью повышения выхода выделенной ДНК кратность разбавления образца можно уменьшить в результате использования более концентрированных лизирующих растворов.

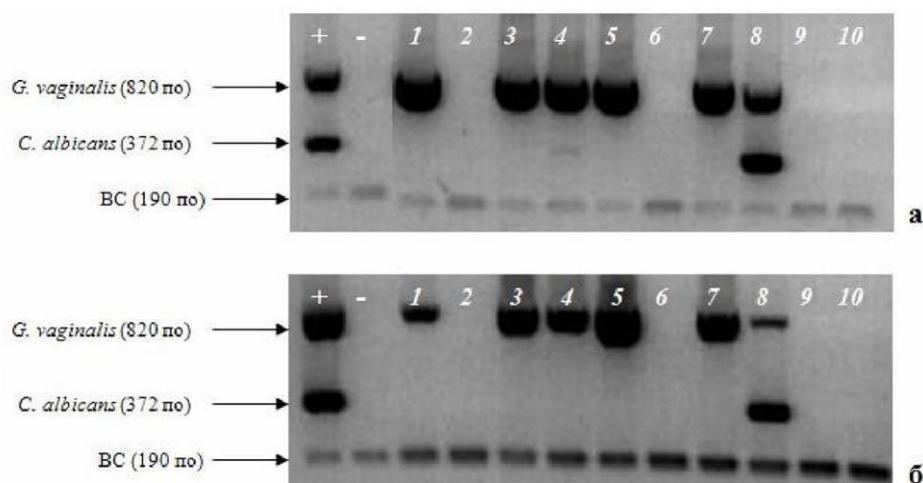


Рисунок 5.19 - Электрофореграмма ПЦР-фрагментов (2 % агарозный гель), полученных с использованием ДНК микроорганизмов *Gardnerella vaginalis* и *Candida albicans*, выделенных из образцов урогентиальных мазков. Ряд а: выделение ДНК с помощью набора Диатом™ДНК Преп 100 («ИзоГен», Россия). Ряд б: выделение ДНК с использованием спин-картриджей с ПАНИ-содержащим сорбентом. Стрелками отмечено положение ПЦР-фрагментов, относящихся к внутреннему стандарту (190 п.о.), *C. albicans* (372 п.о.) и *G. vaginalis* (820 п.о.) [352, 382].

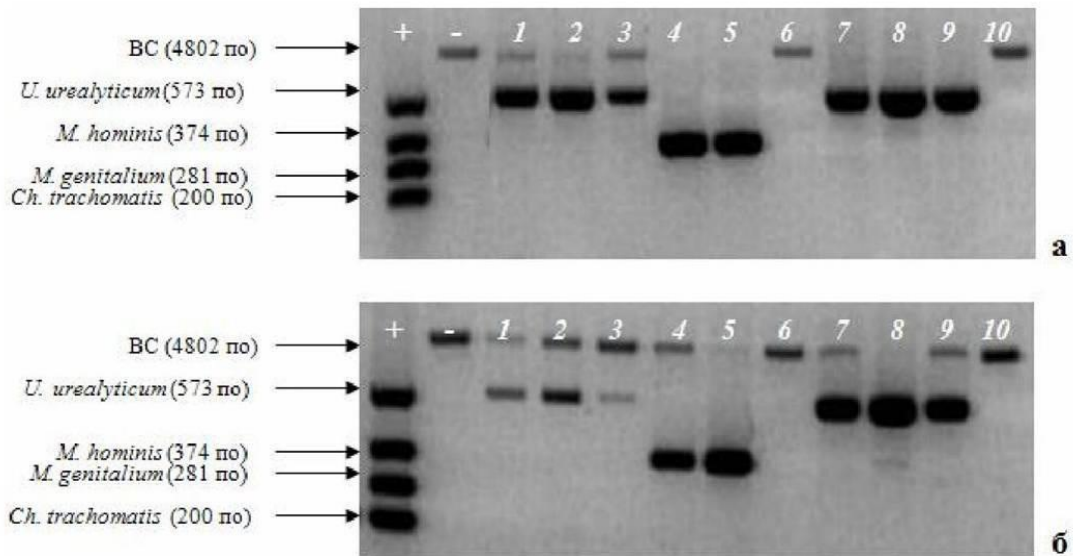


Рисунок 5.20 - Электрофореграмма ПЦР-фрагментов (2 % агарозный гель), полученных с использованием ДНК микроорганизмов *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, и *Mycoplasma genitalium*, выделенных их образцов урогентиальных мазков. Ряд *а*: выделение ДНК с помощью набора Диатом™ДНК Преп 100 («ИзоГен», Россия). Ряд *б*: выделение ДНК с использованием спин-картриджей с ПАНИ-содержащим сорбентом. Стрелками отмечено положение ПЦР-фрагментов, относящихся к *Ch. trachomatis* (200 п.о.), *M. genitalium* (281 п.о.), *M. hominis* (374 п.о.), *U. urealyticum* (573 п.о.) и внутреннему стандарту (4802 п.о.) [352, 382].

Пробоподготовка в соответствии с протоколом II включает около 20 манипуляций, процедура по протоколу I - всего 8 манипуляций. Поскольку протокол II более трудоемок и продолжителен (вследствие многостадийности) по сравнению с протоколом I, можно утверждать, что методы пробоподготовки с использованием сорбентов, демонстрирующих эффект «*негативной селекции*» в отношении ДНК, являются эффективной альтернативой известным многостадийным процедурам выделения.

Аналогичные тесты с теми же клиническими образцами проводили с мембранным сорбентом ПАНИ-ММК-0.45. Несмотря на то, что средние значения емкости мембранного сорбента по белку (~ 0.9 мг/г_{сорбента}) на порядок ниже, чем емкость дисперсного Si-500-ПАНИ сорбента (~ 8.5 мг/г_{сорбента}), полученные результаты полностью совпали с результатами, представленными на Рисунках 5.19 и 5.20. Различие в пробоподготовке заключалось в нанесении меньшего объема лизата на мембранный сорбент (25 мкл) по сравнению с объемом, наносимым на картридж с S-500-ПАНИ-сорбентом (200 мкл). Получены официальные заключения от ООО «НПФ Генлаб» (г. Москва) и от ООО «Амбер» (г. С.-Петербург) об эффективности применения мембранных сорбентов (содержащих как не гофрированные, так и

гофрированные мембранные сорбенты) для ускоренной ПЦР-диагностики возбудителей инфекционных заболеваний человека (Приложения 1 - 3).

Убедительным примером, подтверждающим высокую эффективность использования разработанных полимерсодержащих сорбентов для проведения одностадийного выделения ДНК из клинических образцов с целью обнаружения патогенов человека, служат результаты тестов по выделению ДНК из предварительно инактивированных клинических образцов мокроты, содержащих различные количества клеток возбудителей туберкулеза человека, известных под общим названием «*Mycobacterium tuberculosis complex*» («микобактерия туберкулезного комплекса» – *MTBC*). Термин «*MTBC*» объединяет следующие виды микобактерий: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* и *M. mungi*. Эта часть исследований была проведена на базе ЗАО «НПФ Синтол».

Сравнивали эффективность выделения ДНК из лизированных образцов мокроты больных туберкулезом, проведенного двумя способами: с помощью методики, основанной на использовании спин-картриджей с ФП-ПАНИ-сорбентом и с использованием роботизированной системы Tecan Freedom EVO® PCR (Tecan Trading AG, Швейцария). Автоматизированная процедура выделения ДНК включала этап сорбции микобактериальной ДНК на магнитных частицах. Благодаря тому, что на поверхности магнитных частиц иммобилизованы олигонуклеотиды с известной последовательностью азотистых оснований, которая комплементарна последовательности в участке-мишени в молекулах ДНК микобактерии, последние селективно связывались с поверхностью носителя. Не связавшиеся примеси (в том числе, молекулы ДНК, не содержащие последовательность-мишень) удалялись на следующем этапе. Затем очищенную ДНК десорбировали и элюировали с поверхности магнитных частиц, а затем непосредственно использовали в ПЦР-анализе в результате реализации ряда последовательных операций, предусмотренных разработчиками системы. Напротив, при использовании картриджей с ФП-ПАНИ-сорбентом выделение микобактериальной ДНК проводилось в одну стадию.

Выделенные обоими сравниваемыми способами препараты ДНК использовали в качестве матриц при проведении ПЦР в реальном времени. В исследовании использовали модельные образцы мокроты, содержащие 600 КОЕ/мл, а также клинические образцы от пациентов, отобранных случайным образом.

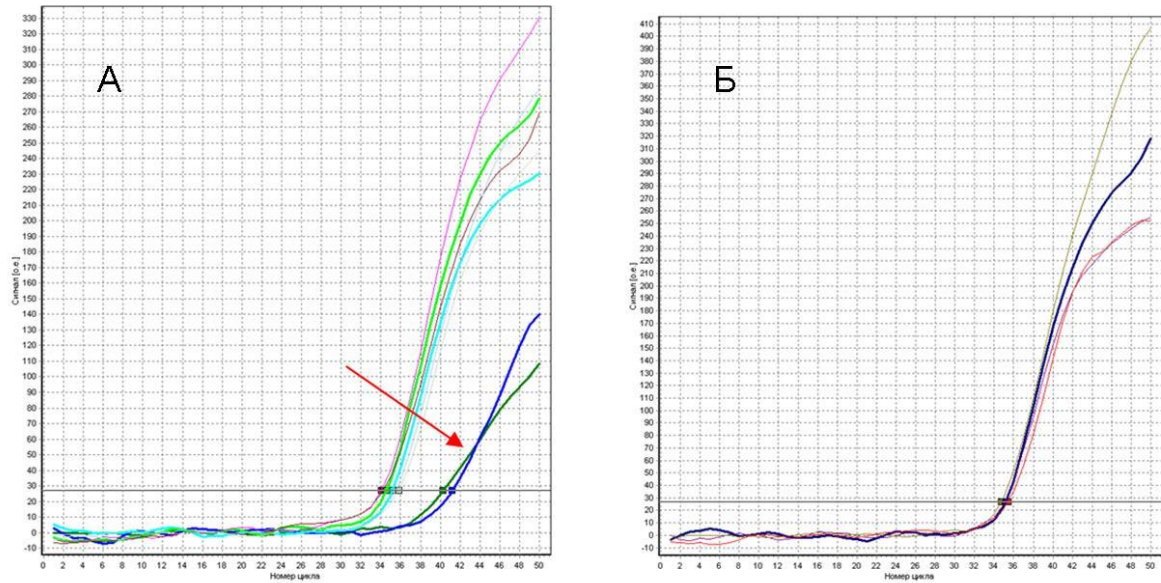


Рисунок 5.21 - Результаты ПЦР в реальном времени с использованием ДНК микобактерий, выделенной на картриджах с ФП-ПАНИ-сорбентом из лизатов модельных образцов мокроты больных туберкулезом. Образцы содержали 600 КОЕ/мл. А - стрелкой указаны кривые, полученные при анализе исходных не очищенных лизатов. Б - кривые, соответствующие очищенным с помощью сорбента не разбавленным образцам, окрашены в красный и коричневый цвета; кривая, соответствующая образцу разбавленного лизата без очистки на ФП-ПАНИ-сорбенте, окрашена в синий цвет [388].

На Рисунке 5.21 и в Таблице 5.4 представлены результаты ПЦР в реальном времени, проведенной с модельными образцами. Из Рисунка 5.21 следует, что амплификация ПЦР-фрагментов с использованием ДНК из образцов, не прошедших очистку на картридже с сорбентом (т. е. из исходных неочищенных лизатов), заметно снижена (кривые, обозначенные стрелкой). После разбавления этих образцов эффективность амплификации восстанавливается (за счет уменьшения содержания ингибиторы полимеразы в пробе), поэтому количество ПЦР-фрагментов становится сопоставимо с количеством ампликонов, полученных на образцах ДНК, очищенных с помощью ФП-ПАНИ-сорбента. В Таблице 5.4 даны контрольные значения порогового цикла (C_t) и концентрации ДНК в образцах ($10^7, 10^5, 10^3, 10^2$ КОЕ, соответственно).

Приведенные данные подтверждают, что при использовании ФП-ПАНИ-сорбента чувствительность ПЦР-детекции не снижается, а анализируемую ДНК удается определять при содержании в пробе ~ 10 ДНК-копий. Из этого следует, что благодаря использованию ФП-ПАНИ-материала происходит удаление ингибиторов ПЦР, а исходное количество ДНК, изначально присутствующее в образце, сохраняется.

Таблица 5.4 – Результаты ПЦР в реальном времени. Значения порогового цикла (C_t) и рассчитанные количества копий ДНК в исследованных образцах: 1 – 9 – модельные образцы мокроты (содержащие 600 КОЕ/мл) после очистки на картриджах с ФП-ПАНИ-сорбентом [388].

Образец	Пороговый цикл (C_t)	Рассчитанное количество копий ДНК
исходный лизат	40.2	0.4
исходный лизат	41.03	0.22
разбавленный лизат	35.23	13.72
1	35.28	13.19
2	34.27	27.10
3	33.77	38.50
4	33.70	40.41
5	35.69	9.84
6	35.28	13.19
7	35.04	15.69
8	34.66	20.48
9	35.08	15.24
контрольные разведения:		
10000000	16.20	9.948E6
100000	21.58	2.193E5
1000	29.14	1026.34
100	32.45	97.94

Результаты тестов, полученные с использованием модельных образцов, позволили предположить, что применение разработанного ФП-ПАНИ-сорбента для одностадийного выделения ДНК из клинических образцов обеспечит быстрое получение очищенных препаратов НК, непосредственно пригодных для проведения ПЦР-диагностики.

Чтобы подтвердить это предположение, сравнивали количество копий ДНК, выделенной из образцов мокроты с использованием картриджей с ФП-ПАНИ-сорбентом и в результате автоматизированного процесса выделения/амплификации (Таблица 5.5). Объем исходного материала, необходимый для автоматической обработки, вдвое превышал объем образца, требуемый для выделения с помощью картриджей, но поскольку при автоматическом выделении ДНК расходовалась лишь половина взятого объема образца, количество исходного материала в обоих случаях сопоставимо. Важно отметить, что в результате автоматического выделения получали в 4 раза меньший объем препарата ДНК, чем при выделении с помощью картриджа с ФП-ПАНИ-сорбентом. В то же время, для проведения ПЦР в автоматическом режиме требовался в 2.5 раза бóльший объем пробы, чем после пробоподготовки с использованием картриджей. Это означает, что для проведения автоматизированной

амплификации требуется 10-кратное количество ДНК по сравнению с протоколом ПЦР, проводимым с ДНК, выделенной с помощью ФП-ПАНИ-сорбента.

Таблица 5.5 - Количество ПЦР-фрагментов микобактериальной ДНК, выделенной из клинических образцов одностадийным картриджным и многостадийным автоматизированным методами [388].

Образец	Количество ДНК, копий/объем		
	выделение с помощью ФП-ПАНИ-сорбента, 10 мкл	автоматическое выделение, 25 мкл	автоматическое выделение, с учетом разведения
1	4579	3254	325
2	65	не определено	не определено
3	5006	3572	357
4	не определено*	не определено	не определено
5	733220	23693	2369
6	98	3	< 1
7	12	2	< 1
8	178	32	3

* в пробе отсутствовали микобактерии.

В Таблице 5.5 приведены данные о количестве ПЦР-фрагментов, полученных с использованием микобактериальной ДНК, выделенной из клинических образцов с помощью сравниваемых методов (одностадийного ручного и многостадийного автоматизированного), а также количество ПЦР-фрагментов, полученное в результате автоматической амплификации с учетом разбавления образцов. Из этих данных следует, что эффективность амплификации фрагментов ДНК, проводимой в автоматическом режиме, составила всего от 0.3 до 7 % по сравнению с эффективностью выделения ДНК на картриджах с ФП-ПАНИ-сорбентом.

Полученные результаты подтвердили высокую эффективность применения разработанных БЭ на основе ФП-ПАНИ-сорбентов в пробоподготовке, предшествующей ПЦР-анализу. Использование разработанных БЭ не только обеспечило снижение потерь анализируемой ДНК (присутствующей в исходных клинических образцах), но также существенно повысило чувствительность ПЦР-анализа благодаря удерживанию сорбентом ингибиторов полимеразы по сравнению с результатами, полученными в результате применения автоматизированного метода выделения.

В ходе дальнейших исследований было показано, что использование картриджей с разработанными сорбентами значительно облегчает пробоподготовку при диагностике фитопатогенов, например, почвенных грамотрицательных

палочковидных бактерий *Agrobacterium tumefaciens* C58, вызывающих опухоли (галлы) у растений и являющихся условно патогенными микроорганизмами для людей, страдающих иммунодефицитами. Нелишне отметить, что ДНК, выделенную из этих агробактерий, используют в генной инженерии для трансформации растений.

Сравнивали результаты, полученные после выделения агробактериальной ДНК из культуральных лизатов с помощью одностадийной процедуры с использованием картриджа с ФП-ПАНИ сорбентом, а также после проведения фенол-хлороформной экстракции, после выделения на картриджах компании Nexttec™ GmbH (Германия) и после выделения с помощью набора «Проба ГС» (ООО НПФ «ДНК-Технология», Россия). Электрофореграмма выделенных препаратов ДНК, аликвоты которых наносили на 1 % агарозный гель, представлена на Рисунке 5.22.

Из представленной электрофореграммы следует, что максимальный выход ДНК обеспечивается применением картриджей с ФП-ПАНИ сорбентом. Количество ДНК, выделенной с помощью разработанного сорбента, существенно выше, чем ее содержание в элюатах, полученных с помощью наборов, взятых для сравнения, и как минимум, в три раза превышает количество, полученное в результате фенол-хлороформной экстракции. В описываемом эксперименте сравнивали результаты, полученные после многостадийного выделения ДНК (таких как фенол-хлороформная экстракция и последовательная сорбция-десорбция ДНК на колонках, входящих в набор «Проба ГС»), с результатами одностадийного выделения ДНК на картриджах с ФП-ПАНИ-сорбентом и на картриджах компании Nexttec™ GmbH. В последнем случае для выделения ДНК применяли спин-колоноки, содержащие катионообменник (отрицательно заряженный сорбент на основе сшитого сополимера стирола с дивинилбензолом) в условиях, препятствующих удерживанию макромолекул ДНК.

Сравнительно невысокий выход ДНК, выделяемой при использовании колонок компании Nexttec™ GmbH, по-видимому, является следствием связывания присутствующих в лизате положительно заряженных молекул с отрицательно заряженными группами на поверхности сорбента, в результате чего отрицательный суммарный поверхностный заряд быстро нивелируется и возникают условия для удерживания отрицательно заряженных макромолекул ДНК. Сделанное заключение косвенно подтверждается результатами сравнительного исследования, проведенного независимыми экспертами в рамках европейской инициативы DNA Bank Network [389]. В этом исследовании сравнивали около 30 различных протоколов выделения ДНК из прокариот, растений, грибов и тканей животных, разработанных 18 компаниями, в том числе, протоколы с использованием спин-колонок, предлагаемых

Nexttec™ GmbH. Последние оказались наименее эффективными как по количеству ДНК, выделяемой из тканей растений или животных, так и по степени ее очистки.

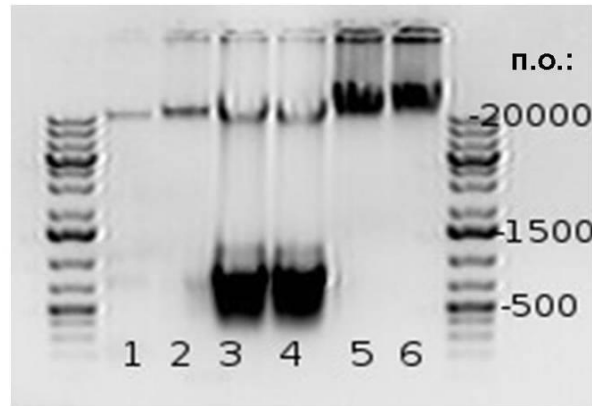


Рисунок 5.22 - Электрофореграмма в 1 % агарозном геле очищенных препаратов ДНК, выделенных из культуры *A. tumefaciens* C58 (10^9 клеток/мл) с помощью: 1 - фенол-хлороформной экстракции; 2 - набора 1-Step компании Nexttec™ GmbH (Германия); 3, 4 – набора «Проба-ГС» (ООО НПО «ДНК-Технология», Россия); 5, 6 – картриджей с ФП-ПАНИ сорбентом.

Количество выделенной различными методами агробактериальной ДНК оценивали по результатам ПЦР в реальном времени. Из данных Таблицы 5.6 следует, что применение ФП-ПАНИ-сорбента обеспечивает наибольший выход ДНК (превосходящий примерно на 25 % количество ДНК после выделения методом «Проба ГС», более чем в 2 раза – после выделения с использованием набора nexttec™ 1-Step и более чем в 3 раза – после фенол-хлороформной экстракции).

Таблица 5.6 – Относительная концентрация ДНК в элюатах, полученных различными методами (средние значения по двум экспериментам).

Метод выделения	C_p^*	Относительная концентрация ДНК, %**
картриджи с ФП-ПАНИ-сорбентом	22.4	100
«Проба-ГС»	22.8	76
nexttec™ 1-Step	23.6	44
фенол-хлороформная экстракция	24.1	31
неочищенный лизат (отрицательный контроль)	32.3	-

* C_p - характеристический цикл амплификации (*crossing point*), автоматически рассчитываемый при использовании амплификатора «ДТ-96» (ООО НПФ «ДНК-Технология», Россия).

**Относительная концентрация ДНК в элюате: $OK_{образца} = 2^{(C_p \text{ ФП-ПАНИ} - C_p \text{ образца})}$. За 100 % принимали содержание ДНК в элюате, полученном при использовании ФП-ПАНИ-сорбента.

Низкие значения C_p при амплификации ПЦР-фрагментов с использованием ДНК, выделенной с помощью ФП-ПАНИ-сорбента, указывают на отсутствие в получаемых элюатах примесей, ингибирующих полимеразу. Такие примеси могут присутствовать в элюате по двум причинам. Во-первых, если сорбент не достаточно хорошо отмыт, то при элюции ДНК с поверхности сорбента могут увлекаться остаточный мономер, молекулы допанта, не прореагировавший окислитель, слабо связанные с поверхностью полимерные частицы и т. п. Во-вторых, при наличии в лизате компонентов, слабо удерживаемых сорбентом, последние вместе с ДНК будут попадать в элюат.

Для ответа на вопрос, присутствуют ли в составе разработанного сорбента примеси, ингибирующие полимеразу, в реакционную смесь для проведения ПЦР добавляли ДНК из *A. tumefaciens* C58, выделенную по протоколу «Проба ГС», специфические праймеры и ДНК-зонд, гибридизующийся с участком в гене *VirD2* *A. tumefaciens* C58 (расположенном в Ti-плазмиде, индуцирующей образование опухолей у растений), а также аликвоты ТЭ-буфера, пропущенного через колонки с ФП-ПАНИ-сорбентом. Полученные значения C_t (пороговый цикл) приведены в Таблице 5.7.

Таблица 5.7 – Средние значения (по двум экспериментам) порогового цикла амплификации после пропускания образцов ТЭ-буфера через картриджи с ФП-ПАНИ-сорбентом.

Образец	C_t^*
чистый ТЭ-буфер	25.6
ТЭ-буфер, пропущенный через сорбент ФП-ПАНИ (лот 1)	25.4
ТЭ-буфер, пропущенный через сорбент ФП-ПАНИ (лот 2)	25.5

* C_t - пороговый цикл амплификации (*threshold cycle*), автоматически рассчитываемый при использовании амплификатора «ДТ-96» (ООО НПФ «ДНК-Технология», Россия).

С целью проведения этого теста из 10 различных лотов ФП-ПАНИ-сорбента брали навески из двух случайным образом отобранных лотов. Поскольку ПЦР с элюатами, полученными после пропускания ТЭ-буфера через сорбент, проходила практически одинаково, можно заключить, что с поверхности сорбентов не выделяются примеси, ингибирующие полимеразу.

На практике нередко возникает ситуация, когда необходимо провести повторный анализ с использованием ранее полученных препаратов очищенной ДНК. Поэтому одной из обязательных характеристик сорбционного материала,

применяемого для выделения ДНК из биологических смесей, является стабильность полученных препаратов ДНК при хранении.

Стабильность выделенных препаратов бактериальной ДНК оценивали методом ПЦР в реальном времени через сутки, через неделю и спустя месяц после выделения. Результаты представлены в Таблице 5.8.

Таблица 5.8 - Оценка стабильности ДНК при хранении (% от содержания ДНК в свежевыделенных элюатах).

ФП-ПАНИ-сорбент	Содержание ДНК в элюатах, % (средние значения по четырем тестам)			
	свежевыделенная ДНК	1 сутки	8 суток	31 сутки
лот 1	100	98±2	97±2	98±2
лот 2	100	98±2	99±2	97±2

Из данных Таблицы 5.8. следует, что в препаратах ДНК, выделенных с помощью картриджей с ФП-ПАНИ-сорбентом, не содержатся примеси, вызывающие деградацию ДНК при хранении препаратов. Такими примесями могут быть, например, низкомолекулярные кислоты, присутствие которых приводит к апуринизации и фрагментации макромолекул ДНК.

Таким образом, высокая эффективность применения спин-картриджей с разработанными сорбентами, демонстрирующими эффект «*негативной селекции*» в отношении ДНК, подтверждена многочисленными примерами их использования в пробоподготовке для одностадийного выделения бактериальной ДНК из различных биологических образцов. Как разработанные сорбенты, так и получаемые препараты ДНК сохраняют свои свойства при хранении.

Многообещающие результаты были получены в результате использования МК-наконечников, модифицированных ПАНИ-покрытиями, при экспресс-выделении ДНК бактериальных патогенов человека. Использование полимермодифицированных МК оправдано при выделении НК из возбудителей особо опасных инфекций, когда необходимо до минимума сократить число стадий пробоподготовки и исключить применение многократно используемых устройств (например, настольных центрифуг) с целью максимального сокращения риска контаминации.

Ниже приведены результаты выделения ДНК из модельных смесей «простого» состава (см. Таблицу 5.1), точнее, из смеси ДНК с белком и из бактериальных культур. Для оценки способности ПАНИ-модифицированных МК связывать белок,

смешивали растворы ДНК (DNA Shared/denatured E213-5ML производства Amresco Inc., США, 20 мг/мл) и БСА (0.1 мг/мл). Аликвоты приготовленной смеси (содержащие биополимеры в суммарной концентрации 4.6 мг/мл) смешивали с тремя буферными растворами: с ДНК-буфером из набора AmpliSens (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия), с «Буфером Б2» (разработанным в лаборатории «Полимеры для биологии» ИБХ РАН) и с лизирующим буферным раствором AmpliSens (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия). Полученные смеси (по 200 мкл – т. е. в объеме, сопоставимым с объемами, наносимыми на картриджи с дисперсными сорбентами) втягивали в исследуемые МК-наконечники без использования дополнительного оборудования за счет капиллярных эффектов. После инкубирования заполненных пробамии МК-наконечников при комнатной температуре в течение 3 мин наконечники надевали на механический дозатор (пипетку) и выдавливали элюат. Концентрации ДНК и белка в полученных элюатах определяли спектрофотометрически. Оценивали количество ДНК в элюатах, полученных в результате использования немодифицированных и ПАНИ-модифицированных МК-наконечников, а также потери ДНК при выделении. Определяли степень очистки ДНК от примесей по отношениям величин поглощения при длинах волн 260 нм и 280 нм.

В результате было установлено, что объем исследуемого образца (200 мкл) полностью заполнял МК-наконечник за счет капиллярных сил. После выдерживания МК-наконечника в течение 3 мин при комнатной температуре исследуемый раствор выдавливали из наконечника в микропробирку для проведения тестов. В Таблице 5.9 представлены относительные и абсолютные значения содержания ДНК в полученных элюатах, а также приведена оценка чистоты полученных препаратов ДНК, сделанная на основании отношения величин поглощения элюатов при 260 нм и 280 нм.

Из полученных данных следует, что при использовании немодифицированного МК-наконечника удерживается до 54 % ДНК, в то время как при использовании ПАНИ-модифицированного МК-наконечника ДНК выделяется практически без потерь (выход ДНК составляет не менее 98 % от исходного содержания ДНК в образце). По степени очистки от белка выделенный препарат ДНК (показатель 1.802) превосходит как исходный препарат ДНК, так и препарат, полученный в результате использования немодифицированного наконечника. В условиях проведенного теста препарат считается чистым, если отношение значений 260нм/280нм приблизительно равно 1.8.

Таблица 5.9 - Результаты выделения ДНК с использованием МК-ПАНИ-наконечников.

Оцениваемый параметр	Исходный образец	Образец после пропускания через немодифицированный МК-наконечник	Образец после очистки на ПАНИ-МК-наконечнике
конечная концентрация ДНК ($C_{\text{кон.}} = A_{260} \cdot K^*$), мкг/мл	4578	2100	4472
количество выделенной ДНК ($m_{\text{кон.}} = C_{\text{кон.}} \cdot V_{\text{кон.}}$), мкг	915	420	894
отношение A_{260}/A_{280}	1.787	1.796	1.802
степень чистоты препарата выделенной ДНК	чистый	чистый	чистый

*К – коэффициент разведения препарата перед измерением ($K = 40$).

Для выделения ДНК с помощью ПАНИ-модифицированных МК-наконечников наряду с культурой *E. coli*, взятой в качестве образца для сравнения, использовали культуры возбудителей холеры (*Vibrio cholerae*) и иерсениоза (псевдотуберкулеза) (*Yersinia pseudotuberculosis*). Указанные грамотрицательные бактерии присутствовали в образцах в концентрации $1 \cdot 10^9$ клеток/мл. Эта часть исследования была проведена на базе ФКУЗ «МИКРОБ» (г. Саратов). Сравнивали количество выделенной ДНК и степень ее очистки от белков (по значению A_{260}/A_{280}), на основании чего делали заключение о чистоте полученного препарата. Для выделения использовали немодифицированные МК-наконечники и МК-наконечники, поверхность капилляров в которых была покрыта слоем ПАНИ. Параллельно ДНК выделяли из тех же образцов с помощью набора «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия) по многостадийной методике.

Полученные результаты представлены в Таблице 5.10. Из данных этой таблицы можно определить, что при использовании немодифицированного наконечника удерживается от 66 до 85 % ДНК. Значение A_{260}/A_{280} равно в среднем 1.42 (у исходного препарата – 1.38), из чего следует, что при использовании немодифицированных наконечников ДНК практически не очищается от примесей (в первую очередь от белков).

Таблица 5.10 - Результаты выделения бактериальной ДНК с помощью МК-наконечников (образцы выдерживали в МК-наконечниках 3 мин).

Штамм	Метод очистки	Конечная концентрация ДНК, мкг/мл	Количество выделенной ДНК ($m=C \cdot V$), мкг	A_{260}/A_{280}	Степень чистоты выделенной ДНК
<i>V. cholerae</i>	лизат	4.152	0.8304	1.356	много примесей
<i>то же</i>	МК немодифицированный	3.296	0.6592	1.542	примеси
<i>то же</i>	МК-ПАНИ	2.868	0.5736	1.707	чистый
<i>то же</i>	«РИБО-преп»	1.386	0.2772	1.868	чистый
<i>Y.pseudo-tuberculosis</i>	лизат	4.502	0.9004	1.494	примеси
<i>то же</i>	МК немодифицированный	3.834	0.7668	1.358	много примесей
<i>то же</i>	МК-ПАНИ	2.180	0.436	1.652	относительно чистый
<i>то же</i>	«РИБО-преп»	1.738	0.3476	1.906	чистый
<i>E.coli</i>	лизат	4.492	0.8984	1.305	много примесей
<i>то же</i>	МК немодифицированный	2.960	0.592	1.350	много примесей
<i>то же</i>	МК-ПАНИ	3.196	0.6392	1.565	относительно чистый
<i>то же</i>	«РИБО-преп»	1.944	0.3888	1.714	чистый

Напротив, при использовании ПАНИ-модифицированного наконечника в зависимости от вязкости образца (лизата) удается выделить от 48 до 71 % ДНК. Это количество может быть увеличено дополнительной однократной промывкой наконечника путем забора и выдавливания 50 – 100 мкл воды. Тем самым, однако, вводится дополнительная стадия пробоподготовки, а препарат ДНК дополнительно разбавляется. По сравнению с исходным лизатом получаемые препараты ДНК содержат существенно меньше примесей. На это указывают значения A_{260}/A_{280} , равные в среднем 1.64 (у исходного препарата – 1.38). Наибольшая степень очистки достигнута для препарата ДНК из *V. Cholerae*. Следует отметить, что степень очистки повышалась в среднем на 15 % за счет увеличения времени выдерживания образца в наконечнике с 3 до 5 мин (в Таблице 5.10 эти значения не указаны).

Препараты ДНК, выделяемые при использовании многостадийной методики с помощью набора «РИБО-преп» отличались высокой чистотой (среднее значение отношения A_{260}/A_{280} достигало 1.83), однако выделение сопровождалось большими

потерями ДНК из-за двух последовательных отмывок – элюаты содержали в среднем не более 33 – 43 % ДНК, присутствующей в исходном лизате. Кроме того, по сравнению с пробоподготовкой, основанной на использовании ПАНИ-модифицированных МК-наконечников (отнимающей не более 3 – 5 мин), процедура, осуществляемая с помощью набора «РИБО-преп», требует значительно больше времени (20 - 30 мин), а для ее выполнения необходимо дополнительное оборудование (например, микроцентрифуга, вакуумный отсасыватель) и специальные реагенты.

5.1.2. Одностадийное выделение ДНК (РНК) из вирусов

В некоторых экспериментах, описанных в предыдущем подразделе, для усложнения состава модельных образцов, содержащих бактерии, к ним добавляли вирусные частицы (фаг λ). Представлялось необходимым и важным выяснить, насколько эффективным может быть применение разработанных БЭ для одностадийного эксперсс-выделения ДНК из клинических образцов, содержащих вирусы.

Ниже приведены примеры, доказывающие эффективность применения разработанного ФП-ПАНИ-содержащего сорбента в пробоподготовке клинических образцов сыворотки крови человека, содержащих вирусную ДНК, для получения очищенных препаратов ДНК, непосредственно пригодных для ПЦР-диагностики.

Прежде чем обсуждать результаты проведенных тестов, следует отметить, что появление в крови (сыворотке) внеклеточной ДНК может являться следствием различных причин, таких как некроз или апоптоз ядеросодержащих клеток крови или клеток эндотелия [390], старение эритроцитов или тромбоцитов (после энуклеации доброкачественных опухолей) [391], а также активная секреция НК во внеклеточное пространство (у онкологических больных) [392]. Кроме того, НК возбудителей инфекционных заболеваний обнаруживаются в крови зараженных пациентов. Содержание экзогенной ДНК в кровотоке пациентов обычно не превышает десятков пкг/мл, тогда как нормальное содержание внеклеточной ДНК составляет около 60 нг/мл. Увеличение этого значения до 100 нг/мл или выше может свидетельствовать о возможном прогрессировании заболевания [391]. Доказано появление низкомолекулярной фракции ДНК в сыворотке крови при лучевой болезни [393] или после перенесения серьезных травм [394]. Содержание кольцевой ДНК в крови повышается из-за аутоиммунных заболеваний [395]. Внеклеточная ДНК плода

присутствует в крови и сыворотке беременных женщин [396], а повышение концентрации ДНК плода в крови матери может указывать на ряд проблем с течением беременности.

Вирусные заболевания (например, гепатит В) характеризуются относительно низким уровнем внеклеточной вирусной ДНК в сыворотке пациента [397]. Использование специфических праймеров и зондов обеспечивает эффективную ПЦР-детекцию ДНК вируса *HBV* (*hepatitis B virus*) в сыворотке крови для ранней диагностики острого вирусного гепатита. Латентные формы или мутантные штаммы гепатита В также могут быть обнаружены методами ПЦР-диагностики, в то время как иммуноферментный анализ не всегда эффективен для выявления таких форм.

В лечебных учреждениях, в которых проводят переливание крови или диагностический анализ крови, крайне важно проверять не только пациентов с выявленными заболеваниями, но и всех доноров крови, чтобы избежать распространения заболеваний, передаваемых при переливании крови (включая вирусные инфекции). В настоящем исследовании отбирали 38 клинических образцов сыворотки от пациентов и доноров крови (часть исследований по выделению ДНК *HBV* проводили на базе ФНИЦ Гематологии). Вирусную ДНК выделяли из лизатов образцов одностадийным методом с помощью картриджей с ФП-ПАНИ-сорбентом. Для сравнения использовали два коммерческих набора для проведения ПЦР-анализа: набор Avicenna HBV-PCR (ООО «Медицинский центр Авиценна», Россия) и набор AmpliSense HBV-470/770-IS (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии, Россия). Процедура выделения ДНК с помощью обоих наборов была многоэтапной. Помимо лизиса образцов сыворотки крови, пробоподготовка включала экстракцию ДНК из лизата с использованием диоксида кремния в присутствии хаотропного агента с последующим вымыванием примесей и элюированием очищенной ДНК.

Отобранные образцы были разделены на пять групп, содержащих вирусную ДНК в разных концентрациях (Таблица 5.11). Первая группа содержала 11 образцов сыворотки от пациентов с хроническим гепатитом В. Присутствие ДНК *HBV* в этих образцах определяли с помощью ПЦР с использованием набора Avicenna HBV-PCR. Вторая группа содержала *HBV*-положительные образцы сыворотки от 10 доноров, содержащие ДНК *HBV*, что было подтверждено с помощью двух выбранных для сравнения наборов для ПЦР-анализа (Avicenna и AmpliSense). Эти образцы сыворотки были определены как «сыворотка с высокой концентрацией *HBV* ДНК» (соответствующие концентрации были выше, чем уровень чувствительности набора AmpliSense, то есть 1000 копий-эквивалентов вирусного генома в 1 мл). Третья группа

содержала *HbsAg*-положительные образцы от 12 доноров. Эти образцы считались положительными в ДНК-тесте на обнаружение *HBV* при использовании набора *Avicenna* (чувствительность около 300 копий-эквивалентов в 1 мл) и отрицательными при использовании набора *AmpliSense*. Таким образом, в образцах этой группы вирусная ДНК присутствовала в более низких концентрациях, нежели уровень чувствительности, обеспечиваемый применением набора *AmpliSense*. Такие образцы были определены как «сыворотка с низкой концентрацией *HBV* ДНК». Четвертая группа содержала два образца сыворотки от *HbsAg*-негативных доноров, чьи реципиенты были инфицированы гепатитом В, вероятно, в результате переливания крови. Для таких пациентов проводили повторный забор крови, и кровь дополнительно тестировали на маркеры гепатита В. Таким образом, оба образца сыворотки этой группы были взяты после повторного забора крови. Доноры из этой группы были определены как «возвратные доноры».

Было известно [398], что 37.5 % *HbsAg*-отрицательных возвратных доноров имели вирусную ДНК в сыворотке крови; у 33.3 % протестированных доноров также были обнаружены ИФА-маркеры *HBV* (анти-*HBs* и *aHBcore [IgG + IgM]* в низких концентрациях). Однако вирусную ДНК, присутствующую в низкой концентрации, удавалось обнаружить только с помощью ПЦР-набора с высокой чувствительностью. Вирусная ДНК не была обнаружена в двух пробах из четвертой группы даже после использования наиболее чувствительного тест-набора *Avicenna*. Три образца сыворотки от здоровых доноров (пятая группа) были использованы в качестве отрицательных контролей. В этих образцах не были обнаружены ДНК- и ИФА-маркеры гепатита В.

В начале исследования тесты проводили с 10 образцами сыворотки из второй группы (доноры с высокой концентрацией *HBV* ДНК). После забора эти образцы хранились при -80°C . Для выделения *HBV* ДНК из этих образцов использовали спин-картриджи, содержащие разработанный ФП-ПАНИ-сорбент. Для сравнения были взяты картриджи, содержащие кремнезем, модифицированный ФП без последующего нанесения слоя ПАНИ, а также картриджи, содержащие ПАНИ-сорбент, полученный в присутствии неактивированного кремнезема по методике, описанной в Главе 2. Образцы сыворотки размораживали и лизировали. Полученные лизаты наносили на картриджи в случайном порядке. Для обнаружения вирусной ДНК в полученных элюатах проводили электрофорез в 2 % агарозном геле.

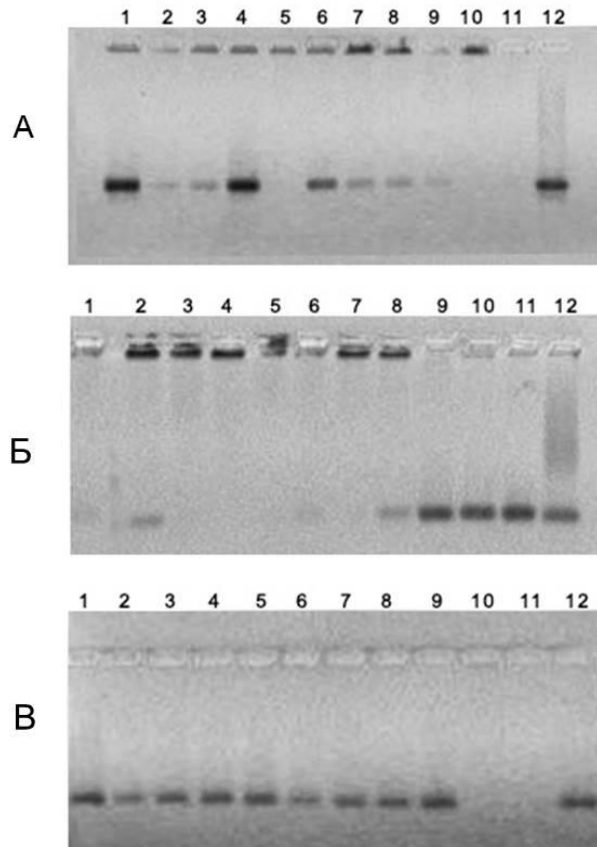


Рисунок 5.23 – Результаты электрофореза в 2 % агарозном геле элюатов, полученных после выделения ДНК *HBV* с помощью Si-500-ФП-сорбента (А), Si-500-ПАНИ-сорбента (Б) и Si-500-ФП-ПАНИ-сорбента (В).

Соответствующие результаты представлены на Рисунке 5.23, из которого следует, что использование ПАНИ-сорбента обеспечивает высокий выход вирусной ДНК, однако ее чистота недостаточна, что подтверждается присутствием значительного количества ДНК в ряде лунок геля (Рисунок 5.23, Б). Сходную ситуацию наблюдали после использования кремнезема, покрытого слоем ФП (Рисунок 5.23, А). Присутствие заметного количества ДНК более чем в половине лунок геля свидетельствовало о наличии в элюатах механических примесей (по-видимому, наноразмерных частиц полимерного покрытия, слабо удерживаемых на поверхности сорбента и переходящих в элюат), препятствующих проникновению молекул ДНК в гель. Воспроизводимые результаты (по количеству выделяемой ДНК, не удерживающейся в лунках геля) были получены с использованием ФП-ПАНИ-сорбента (Рисунок 5.23, В). Таким образом, использование картриджей с ФП-ПАНИ-сорбентом обеспечивает выделение более чистых препаратов вирусной ДНК по сравнению с материалами, модифицированными только ФП- или только ПАНИ-покрытием. Во второй серии тестов сравнивали эффективность применения

разработанного ФП-ПАНИ-сорбента и стандартных процедур выделения ДНК вируса гепатита В с использованием коммерческих наборов Avicenna и AmpliSense.

Полученные результаты представлены в Таблице 5.11. Присутствие вирусной ДНК в образцах из всех пяти выбранных групп было обнаружено после выделения ДНК и проведения ПЦР с использованием набора Avicenna. Видно, что ПЦР-фрагменты вирусной ДНК образуются при использовании всех элюатов, собранных после пропускания через ФП-ПАНИ-сорбент лизатов образцов, относящихся ко всем трем исследуемым группам пациентов. Напротив, с помощью набора AmpliSense вирусную ДНК в образцах третьей группы обнаружить не удалось. Важно отметить, что для выделения ДНК из лизата с помощью набора Avicenna требуется около 20 мин, с помощью набора AmpliSense - около 30 мин, в то время как выделение с помощью ФП-ПАНИ-сорбента проводится всего за 3 – 5 мин. Таким образом, результаты проведенных экспериментов доказали высокую эффективность применения разработанного ФП-ПАНИ-сорбента при экспресс-выделении высокоочищенной вирусной ДНК из клинических образцов сыворотки крови.

Таблица 5.11 – Результаты выявления ДНК вируса гепатита В в образцах сыворотки крови различных групп пациентов и здоровых доноров после проведения ПЦР с элюатами, выделенными с помощью различных методов .

Группа	Источник сыворотки	Кол-во образцов	Метод выделения		
			Avicenna	AmpliSense	ФП-ПАНИ-сорбент
1	пациенты с хроническим гепатитом В	11	11 +	не выделяли	11 +
2	доноры с высокой концентрацией <i>HBV</i> ДНК	10	10 +	10 +	10 +
3	доноры с низкой концентрацией <i>HBV</i> ДНК	12	12 +	12 -	12 +
4	возвратные доноры	2	2 -	2 -	2 -
5	здоровые доноры	3	3 -	3 -	3 -

В одном из наших исследований было показано, что при использовании ПАНИ-содержащих сорбентов удастся изменять выход НК в зависимости от их третичной структуры [356]. Так, рН-чувствительность полимерного покрытия в составе *изо*-ПСК-ПАНИ-сорбента обеспечивает принципиальную возможность

разделения *он*- и *дн*ДНК в зависимости от рН элюента (Рисунок 5.24). Этот эффект был продемонстрирован при выделении НК из модельной смеси, содержащей бактериальную *дн*ДНК, предварительно выделенную из культуры *Agrobacterium tumefaciens* C58, а также *он*ДНК, которая была получена в результате обратной транскрипцией РНК из вируса табачной мозаики (с использованием транскриптазы РНКазы Н+) с последующим щелочным гидролизом РНК. Аликвоты этой смеси наносили на картриджи с *изо*-ПСК-ПАНИ-сорбентом, а полученные элюаты использовали в ПЦР (с добавлением специфических праймеров).

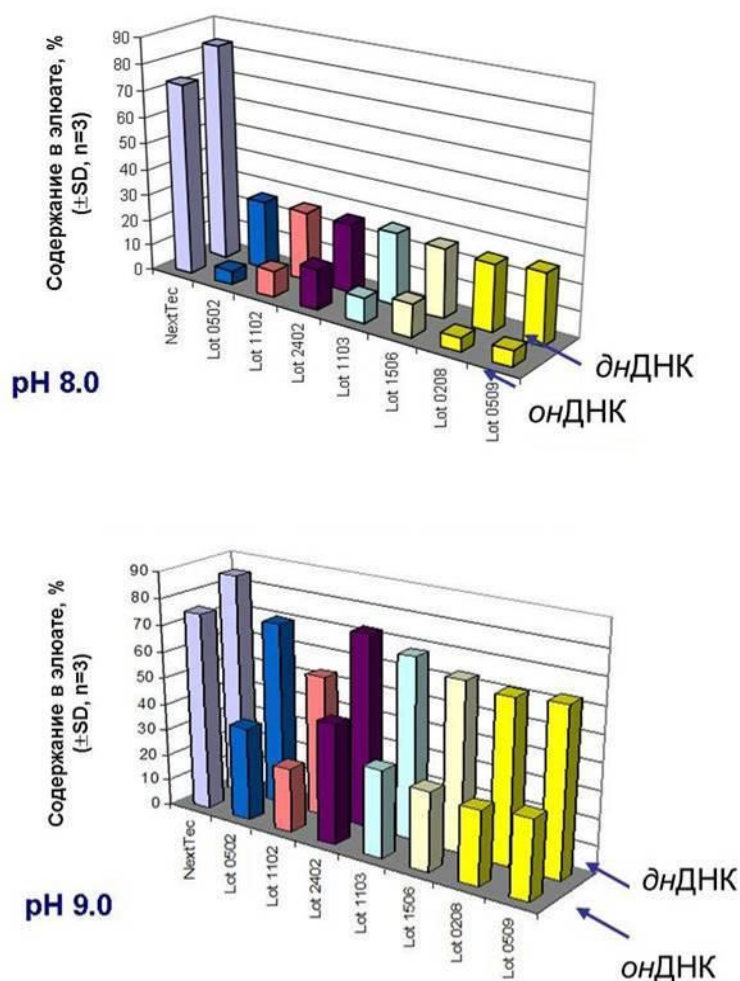


Рисунок 5.24 – Разделение *он*- и *дн*ДНК в зависимости от рН элюента с помощью *изо*-ПСК-ПАНИ-сорбента. За 100 % принято содержание *дн* и *он*ДНК в элюатах, полученных при рН 7.4.

Содержание *он*ДНК и *дн*ДНК в элюатах, полученных при рН 7.4, принимали за 100 % (соответствующие бары на Рисунке 5.24 не представлены). При повышении рН элюента от 7.4 до 8.0 выход НК заметно уменьшался, но повышение рН элюента от 8.0 до 9.0 вновь способствовало увеличению содержания в элюатах как *он*-, так и *дн*ДНК. Одновременно изменялось отношение концентраций *дн*- и *он*ДНК в элюатах

(~ 1:4 при pH 8.0 и ~ 1:2 при pH 9.0). Важно отметить, что при выделении НК из той же смеси с помощью колонок компании NextTec GmbH обнаруженный эффект выявлен не был.

Представленные на Рисунках 5.24 и 5.25 результаты свидетельствуют о том, что при необходимости с помощью ПАНИ-содержащих сорбентов возможно обогащать элюат требуемым компонентом (НК с *он*- или с *дн*-структурой), варьируя pH элюента.

Сходные результаты были получены при одновременном выделении *дн*ДНК и РНК из модельных смесей на картриджах с ФП-ПАНИ-сорбентом и на колонках компании NextTec GmbH (Рисунок 5.25).

Обнаруженный эффект представляет интерес еще и потому, что использованная в модельной смеси *он*ДНК была получена на основе РНК-матрицы, выделенной из вируса. Если эффективность разработанных ПАНИ-содержащих сорбентов при одностадийном выделении вирусной *дн*ДНК из клинических образцов была подтверждена конкретными примерами, то целесообразность применения таких материалов для выделения одонитевой вирусной ДНК требовала дополнительной проверки.

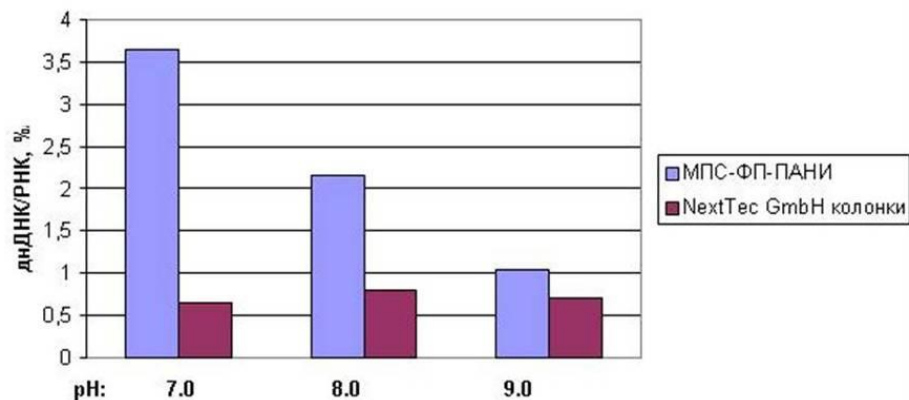


Рисунок 5.25 – Относительное содержание *дн*ДНК и РНК в элюатах в зависимости от pH элюента при использовании ФП-ПАНИ-сорбента.

Известно, что ДНК вируса гепатита В представлена в основном двунитевой макромолекулой (содержащей частично одонитевую кольцевую ДНК) [399]. Для подтверждения эффективности использования разработанного ФП-ПАНИ-сорбента для выделения *он*ДНК из реальных клинических образцов проводили ПЦР-детекцию вируса *TTV* (*transfusion transmitted virus* или *Torque Teno virus*, названный так по имени пациента, у которого он был обнаружен), поскольку ДНК *TTV* представляет собой одонитевую кольцевую молекулу [400]. Исследовали элюаты, полученные в результате пропускания лизатов сыворотки крови больных посттрансфузионным

гепатитом, вызываемым *TTV*, через картриджи с ФП-ПАНИ-сорбентом. Использовали тот же протокол лизиса, что и при выделении ДНК вируса гепатита В. Ожидалось, что выход ДНК *TTV* окажется ниже, чем выход ДНК *HBV* с использованием ФП-ПАНИ-сорбента в тех же условиях пробоподготовки. Полученные результаты показаны на Рисунок 5.26.

ПЦР-анализ образцов на присутствие ДНК *TTV* проводили при 35 и 42 циклах. Действительно, после 35 циклов реакции было получено примерно 17 % ложноотрицательных результатов (3 из 18), однако увеличение числа циклов до 42 обеспечило получение воспроизводимых результатов при отсутствии ложноотрицательных. Следует отметить, что программы автоматической амплификации, проводимой с использованием большинства коммерческих ПЦР-наборов, предусматривают 40 - 45 (нередко 50) циклов реакции. Так, ПЦР-диагностику вируса гепатита В с использованием набора AmpliSence проводили при 45 циклах.

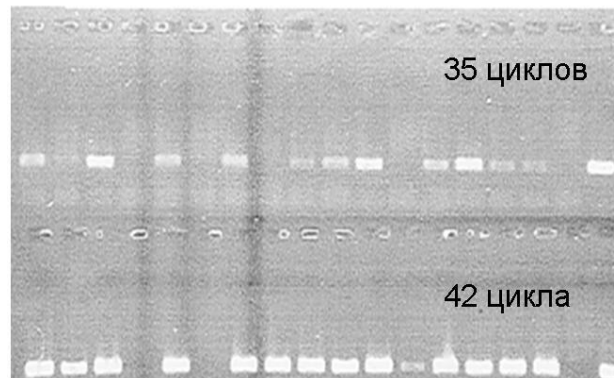


Рисунок 5.26 – Электрофореграмма в 1 % агарозном геле ПЦР-фрагментов вируса *TTV*, выделенного с помощью картриджа с ФП-ПАНИ-сорбентом из сыворотки крови больного посттрансфузионным гепатитом.

Результаты, представленные на Рисунках 5.23, 5.26 и в Таблице 5.11, подтвердили предположение о том, что использование картриджей с ФП-ПАНИ-сорбентом обеспечит необходимую селективность при выделении вирусной ДНК с сохранением высокой чувствительности ПЦР-диагностики при определении вирусной нагрузки в исследуемых образцах. Пробоподготовка с применением сорбента с ФП-ПАНИ-покрытием более эффективна, чем при использовании кремнезема, модифицированного только фторполимером или только ПАНИ. Чистота препаратов вирусной ДНК, получаемых с помощью ФП-ПАНИ-материала, сопоставима или превосходит чистоту препаратов, выделенных с применением коммерческих наборов, основанных на многоэтапной процедуре выделения ДНК с использованием частиц

немодифицированного диоксида кремния. Кроме того, процедура выделения ДНК с использованием ФП-ПАНИ-сорбента (с момента приготовления лизата) занимает в среднем всего 3 - 5 минут, тогда как аналогичные процедуры с применением коммерческих наборов отнимают в среднем в 5 – 10 раз больше времени.

В недавно опубликованных работах (например, в [267, 268, 401]) было показано, что полисопряженные полимеры (использовавшиеся авторами упомянутых работ в виде порошков) в определенных условиях способны эффективно связывать вирусы (безоболочечные и оболочечные), а также бактериальные клетки. Обнаруженное свойство полимеров рекомендовано использовать для деконтаминации содержащих вирусы и бактерии растворов, для очистки воды и др. Можно ожидать, что разработанные в настоящем диссертационном исследовании ПАНИ-модифицированные мембранные сорбенты окажутся не менее эффективной альтернативой полимерным порошкам.

Для подтверждения этого предположения проводили серию экспериментов по удерживанию различных вирусов на картриджах с мембранными сорбентами ММК-0.2-ПАНИ, ММК-0.45-ПАНИ и МФФК-ПАНИ. В качестве модельных микропатогенов использовали РНК-содержащие оболочечные вирусы: два представителя рода *Alphavirus* (семейства *Togaviridae*) – вирус лихорадки Синдбис 1383 клон 3 (*Sindbis fever virus*) и вирус западного энцефаломиелита лошадей (ЗЭЛ - *Western encephalomyelitis virus*), а также вирус гриппа *B/Colorado/06/2017 подобный вирусу B/Victoria/2/87*. Альфавирусы распространены повсеместно, передаются кровососущими членистоногими, вызывают лихорадку и артриты вплоть до инвалидизации (в 20 % случаев) [402]. Опасность вирусов гриппа очевидна.

Альфавирусы выращивали на клетках линии *Vero-6* («Ветбиохим», Россия). Вирус гриппа выделяли из аллантаоисной жидкости куриных эмбрионов. Вирусосодержащую жидкость наносили как на сухие, так и на предварительно смоченные мембраны. Мембранные сорбенты использовали в составе БЭ, в которых мембрану вставляли особым образом (когда скрученная мембрана используется не в качестве фильтра, но в качестве сорбента – Глава 3). В полученных элюатах определяли содержание вируса. При исследовании взаимодействия мембран с частицами вируса гриппа В проводили дополнительные тесты, в которых пропускали вирусосодержащую жидкость через вырезанные из модифицированных мембран фильтры, вставленные в картридж, и определяли содержание вируса в фильтрах.

По стандартным методикам определяли тканевую цитопатогенную дозу, т. е. оценивали изменение величины ТЦД₅₀, - количество вирусных частиц, вызывающее

гибель 50 % клеток монослоя, содержащееся в исходном образце и в элюате, полученном после его пропускания через БЭ. В экспериментах с вирусом гриппа дополнительно оценивали изменение ГА-титра в гемагглютинирующих единицах (1 ГАЕ – количество вирусных частиц, вызывающее агглютинацию примерно 50 % эритроцитов, содержащихся в таком же объеме 1 % суспензии отмытых эритроцитов, что и объем вирусосодержащей жидкости).

Полученные результаты представлены в Таблице 5.12.

Таблица 5.12 – Изменение титра вируса после сорбции вирусных частиц на ПАНИ-содержащих мембранных сорбентах.

Сорбент	Объем наносимого образца, мкл	Вирус	ТЦД ₅₀ /мл		ГА-титр, ГАЕ			
			образец	снижение, во сколько раз	образец	снижение, во сколько раз		
			элюат/фильтрат		элюат/фильтрат			
ММК-0.2-ПАНИ сухой	300	<i>Синдбис</i>	10 ⁷	100	н/о*	н/о		
			10 ⁵					
		<i>ЗЭЛ</i>	10 ⁶	100			н/о	н/о
			10 ⁴					
	200	<i>В/С/В/У**</i>	10 ^{3.5}	~ 3150	512	512		
		~ 1	0					
ММК-0.45-ПАНИ сухой	200	<i>Синдбис</i>	10 ⁸	1000	н/о	н/о		
			10 ⁵					
		<i>ЗЭЛ</i>	10 ⁶	100			н/о	н/о
			10 ⁴					
ММК-0.2-ПАНИ смоченный	200	<i>В/С/В/У</i>	10 ^{3.5}	~ 3150	512	512		
			~ 1		0			
МФФК-ПАНИ сухой	200	<i>В/С/В/У</i>	10 ^{3.5}	~ 100	512	32		
			10 ^{1.5}		16			
МФФК-ПАНИ смоченный	200	<i>В/С/В/У</i>	10 ^{3.5}	~ 100	512	4		
			10 ^{1.5}		128			
МФФК-ПАНИ сухой (<i>фильтр</i>)	200	<i>В/С/В/У</i>	10 ^{3.5}	~ 178	512	8		
			10 ^{1.25}		64			
МФФК-ПАНИ смоченный (<i>фильтр</i>)	200	<i>В/С/В/У</i>	10 ^{3.5}	~ 56	512	2		
			10 ^{1.75}		256			

* н/о – не определяли;

** *В/С/В/У* - вирус гриппа *В/Colorado/06/2017* подобный вирусу *В/Victoria/2/87*.

Основываясь на данных Таблицы 5.12, можно сделать несколько выводов. Во-первых, использование ПАНИ-модифицированных мембранных сорбентов во всех исследованных вариантах (сухие, смоченные, в составе БЭ или в качестве обычных фильтров) позволяет быстро, как правило, на порядки (от 2 до более чем в 3000 раз) снижать вирусную нагрузку в вирусосодержащих жидкостях. Во-вторых, в большинстве проведенных тестов по удерживанию вирусных частиц продемонстрировано преимущество пробоподготовки с использованием ММК-ПАНИ-сорбентов по сравнению с протоколами, в которых использовались МФФК-ПАНИ-мембраны. (Следует заметить, что ПАНИ-модифицированные мембранные сорбенты изначально разрабатывались для одностадийного разделения компонентов смесей биополимеров, но не для удерживания вирусов или клеток; обнаруженное свойство мембранного сорбента удерживать вирусные частицы позволяет отдать преимущество мембранному сорбенту того или иного состава, однако на основании данных об удерживании вирусных частиц нельзя судить об эффективности применения сорбентов, полученных на основе ММК- или МФФК-мембран с целью одностадийного выделения ДНК из биологических смесей.) В-третьих, независимо от того, какую основу использовали при получении мембранного ПАНИ-модифицированного сорбента (ММК- или МФФК-мембраны), этап предварительного смачивания в пробоподготовке не повышает эффективности удерживания вирусных частиц, поэтому этот этап следует исключить. В-четвертых, объем наносимой пробы следует рассчитывать, исходя из количества сорбента (отрезка модифицированной мембраны известной площади), помещенного в БЭ (картридж). Не следует увеличивать объем наносимой пробы, основываясь на данных о пористости носителя, поскольку при использовании БЭ с мембранным сорбентом пористость подложки (исходной мембраны для синтеза ПАНИ-содержащего сорбента) не играет существенной роли – модифицированная мембрана играет роль сорбента, а не фильтра. Это замечание, в-пятых, подтверждено сравнением результатов удерживания вирусных частиц БЭ с мембранами, используемыми в качестве сорбентов, и картриджей, в которых мембраны были установлены в качестве обычных фильтров. В последнем случае удерживание вирусных частиц оказалась минимальным.

Таким образом, разработанные ПАНИ-содержащие композиты полезны не только при селективном разделении смесей биомакромолекул (НК и белков), но также способны эффективно взаимодействовать с более сложными надмолекулярными структурами, такими как вирусные частицы. Следовательно, ПАНИ-модифицированные мембранные сорбенты можно рекомендовать для использования с

целью деконтаминации вирусосодержащих растворов (в более широком смысле - для обеззараживания воды и воздуха), а также, например, в качестве материала для изготовления лицевых повязок для медицинского персонала и пациентов инфекционных отделений больниц с целью их защиты от распространения вирусных инфекций, передающихся воздушно-капельным путем.

5.1.3. Выделение ДНК из тканей эукариот (грибов, растений, животных и человека)

Представленные выше результаты подтвердили, что благодаря применению разработанных полимерсодержащих сорбентов в составе БЭ различных конструкций удается одновременно максимально упростить процедуру выделения НК из бактерий и вирусов, а также обеспечить высокую степень очистки выделяемой НК от примесей, ингибирующих ПЦР. Поскольку ПЦР-диагностика не ограничивается исследованием НК прокариот, для определения границ применимости ФП- и ПАНИ-содержащих сорбентов в пробоподготовке, предшествующей ПЦР-анализу, было необходимо выяснить, насколько оправдано использование этих сорбентов при выделении НК из образцов сложного состава – биологических проб, содержащих клетки грибов (стенки которых включают нерастворимый хитин или его производное – хитозан, и нередко имеют многослойную структуру), а также из тканей растений и из крови.

Известно, что ПАНИ-поверхности эффективно удерживают ионы металлов, в частности, двухвалентные ионы меди и цинка [403, 404]. Логично предположить, что благодаря присутствию в составе ПАНИ-покрытий гетероатома азота и системы полисопряжения, ПАНИ-содержащие материалы будут удерживать органические металлсодержащие соединения, такие как геммы (простетические группы гемопротенинов крови) и хлорофиллы растений. Это свойство представляется весьма важным, поскольку соединения из обеих групп являются мощными ингибиторами полимеразы. При условии эффективного связывания указанных соединений ПАНИ-поверхностью не потребуется предварительно удалять гемоглобин и его фрагменты (при выделении ДНК из лизатов крови) или хлорофиллы (при выделении ДНК из лизатов тканей растений).

На Рисунке 5.27 представлена электрофореграмма в 1 % агарозном геле ДНК-содержащих элюатов, полученных в результате пропускания лизата листьев табака *Nicotiana Tabacum L.* через картриджи, содержащие по 140 мг Si-500-ПАНИ-сорбента и Si-500-ПТФЭ-сорбента. Лизаты наносили на картриджи с сухим ПАНИ-сорбентом

либо на предварительно смоченный (уравновешенный) 0.05М ТЭ-буфером слой ПТФЭ-содержащего сорбента (из-за низкой смачиваемости поверхности последнего). Половину из образцов растительной ткани во время лизиса дополнительно обрабатывали РНКазой. Спектрофотометрический анализ полученных элюатов показал отсутствие поглощения при характеристических длинах волн, соответствующих растительным пигментам, что подтверждает, что препараты очищенной ДНК практически не содержат хлорофиллов и, таким образом, непосредственно пригодны для проведения ПЦР-анализа.

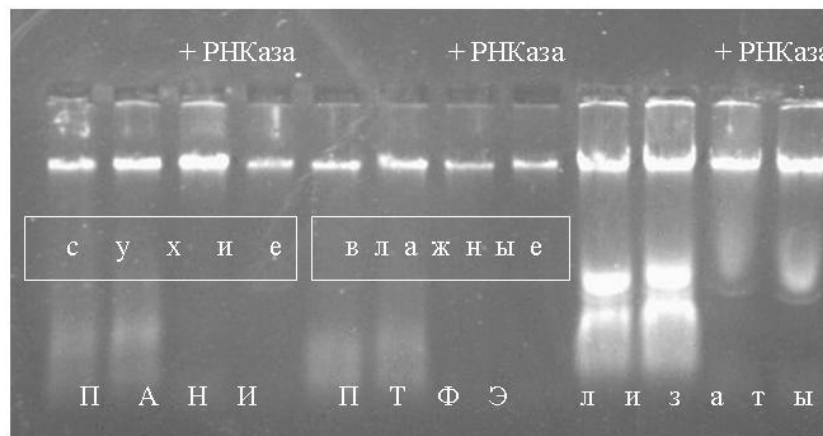


Рисунок 5.27 - Электрофореграмма в 1 % агарозном геле элюатов, полученных в результате пропускания лизатов листьев табака *Nicotiana Tabacum L.* через карттджы с Si-500-ПАНИ- и с Si-500-ПТФЭ-сорбентами [355].

Из приведенного рисунка следует, что с помощью ПАНИ-содержащего материала удастся выделять большее количество очищенной растительной ДНК по сравнению с материалом, модифицированным перфторполимером, несмотря на то, что в первом случае лизат наносили на сухой сорбент, и определенная доля жидкости с растворенной ДНК (~ 5 %) удерживалась в объеме пор (эту величину определяли, сравнивая объемы наносимых лизатов и полученных элюатов).

Наиболее эффективно связывают порфириновые растительные пигменты ПАНИ-сорбенты, полученные в результате матричной полимеризации анилина в присутствии предварительно иммобилизованной на поверхности носителя полисульфокислоты. По-видимому, в удерживании хлорофиллов участвуют остающиеся на поверхности таких сорбентов свободные сульфогруппы, поскольку как Si-500-ПС-SO₃-ПАНИ-сорбент так и Si-500-изо-ПСК-ПАНИ-сорбент, имеющие максимальную поверхностную концентрацию указанных групп, проявляли наибольшее средство к хлорофиллам. При выделении ДНК из лизатов ткани *Nicotiana Tabacum L.* в получаемых элюатах полностью отсутствовали пики поглощения,

соответствующие растительным пигментам, лизаты были полностью обесцвечены. Если величина поглощения разбавленного в 50 раз лизата при $\lambda = 416$ нм составляла 0.19 - 0.2, то оптическая плотность не разбавленного элюата снижалась до 0.04 (т. е. составляла ~ 0.4 % от поглощения лизата). В то же время элюаты, полученные при использовании Si-500-ПАНИ-сорбента, содержали примерно вдвое большее количество порфиринов (значение оптической плотности достигало 0.1, т. е. ~ 1 % по сравнению с их содержанием в исходном лизате).

На Рисунке 5.28 хорошо видно, что выход ДНК, выделяемой из лизатов листьев *Nicotiana Tabacum L.*, пропущенных через картриджи с Si-500-изо-ПСК-ПАНИ-сорбентом (дорожки 4 – 6), заметно превышает количество ДНК, выделенной с помощью набора *NextTec GmbH* (дорожки 2, 3) и с использованием картриджей с Si-500-ПС-SO₃-ПАНИ-сорбентом (дорожки 7, 8).

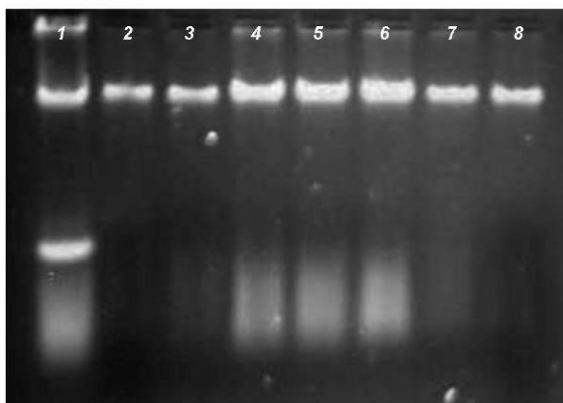


Рисунок 5.28 – Сравнение выхода ДНК *Nicotiana Tabacum L.*, выделенной с помощью различных сорбентов: 1 – лизат листьев *Nicotiana Tabacum L.*; 2 – 8 – элюаты, полученные после использования набора *NextTec GmbH* (2, 3), Si-500-изо-ПСК-ПАНИ-сорбента (4 – 6) и Si-500-ПС-SO₃-ПАНИ-сорбента (7, 8).

Предположение о вкладе остаточных сульфогрупп на поверхности сорбентов в удерживание примесей, загрязняющих выделяемую из растительных тканей ДНК, косвенно подтверждается результатами ПААГ-электрофореза элюатов, полученных после очистки лизатов листьев *Nicotiana Tabacum L.* на картриджах с разработанными ПАНИ-содержащими сорбентами. Из Рисунка 5.29 видно, что элюат, полученный после выделения ДНК на Si-500-изо-ПСК-ПАНИ-сорбенте, практически не содержит белков, а в элюате, полученном после выделения ДНК с помощью Si-500-ПС-SO₃-ПАНИ-сорбента, некоторые белковые фракции содержатся в минорных количествах.

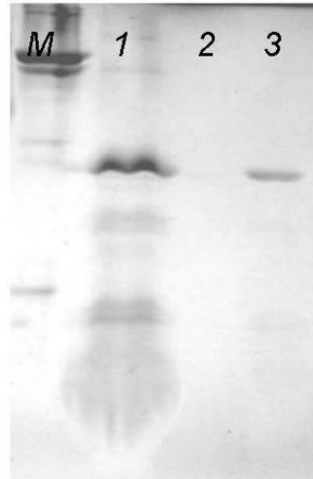


Рисунок 5.29 – Результат градиентного ПААГ-электрофореза элюатов, полученных после очистки лизатов листьев *Nicotiana Tabacum L.* на картриджах с ПАНИ-содержащими сорбентами: М (маркер молекулярного веса) – стандартная смесь белков (220, 67, 60, 36, 18.5 кДа); 1 – лизат растительной ткани; 2 – элюат, полученный при использовании картриджа с Si-500-*изо*-ПСК-ПАНИ-сорбентом; 3 – элюат, полученный при использовании картриджа с Si-500-ПС-SO₃-ПАНИ-сорбентом.

Таким образом, было показано, что с помощью ПАНИ-содержащих сорбентов удается получать препараты растительной ДНК, содержащие незначительное количество ингибиторов полимеразы. Этот вывод подтвержден результатами амплификации фрагментов ДНК агробактерии *A. tumefaciens C58*. ПЦР проводили после добавления к бактериальному лизату равного объема элюата, содержащего растительную ДНК, выделенную с помощью Si-500-ПС-SO₃-ПАНИ-сорбента. На Рисунке 5.30 представлена электрофореграмма полученных ПЦР-фрагментов.

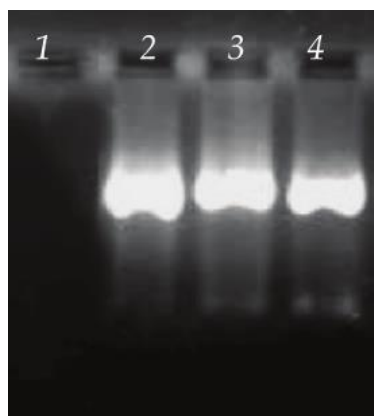


Рисунок 5.30 - Электрофореграмма ПЦР-фрагментов ДНК *A. tumefaciens C58* (2 - 4), полученных после добавления к бактериальному лизату элюатов, содержащих ДНК из листьев табака *N. tabacum L.* Элюаты получали в результате пропускания лизатов растительных тканей через картриджи с 500-ПС-SO₃-ПАНИ-сорбентом (1 - отрицательный контроль, вода) [356].

Результаты проведенных модельных экспериментов подтвердили, что разработанные ПАНИ-содержащие сорбенты обеспечивают одностадийное выделение высокоочищенной ДНК из хлорофиллсодержащих лизатов растительных тканей - более «сложных» по составу объектов по сравнению с лизатами образцов, содержащих бактериальные клетки. Представлялось необходимым подтвердить эффективность применения разработанных сорбентов для выделения ДНК из природных биологических образцов.

Соблюдение мер биологической безопасности предполагает, в частности, контроль над фитосанитарным состоянием сельскохозяйственных растений и почв. Основой для такого контроля является своевременное выявление фитопатогенов. При оценке эффективности применения разработанных сорбентов в пробоподготовке биологических образцов, предшествующей ПЦР-анализу, в качестве объекта исследования использовали пробы, содержащие фитопатогенные грибы рода *Fusarium*, вызывающие различные заболевания у растений (фузариозы, проявляющиеся в виде гнили корней и корнеплодов, увядания сосудов и поражения семян), а также у человека и животных. При поражении семян этими грибами вырабатывается vomитоксин (дезоксиниваленол, *ДОН*), вызывающий при поступлении в пищу человека и животных сильнейшую рвоту и «септическую ангину». Кроме того, в результате контакта с зараженным материалом могут развиваться дерматиты.

Ниже в качестве примера приведены результаты использования картриджей с ФП-ПАНИ-сорбентом в пробоподготовке образцов, содержащих мицелий гриба *Fusarium graminearum*. Наличие ДНК гриба в выделенных препаратах определяли методом FLASH-ПЦР.

Стенка грибного мицелия, как правило, отличается более плотной структурой, нежели стенка бактериальной клетки. Поэтому условия пробоподготовки были несколько изменены по сравнению с условиями выделения бактериальной ДНК (изменяли состав лизирующих растворов и температуру проведения лизиса). Грибную ДНК выделяли из зараженных семян пшеницы – т. е. из объекта более сложного состава, нежели листья, поскольку семена содержат большое количество полисахаридов, фенольных и других соединений, мешающих проведению ПЦР. В качестве контрольного образца использовали лизат грибного мицелия. Дополнительно исследовали влияние наносимого на картридж объема лизата на чувствительность и специфичность ПЦР-анализа.

Данные, приведенные на Рисунке 5.31, подтвердили, что использование ФП-ПАНИ-сорбента в оптимизированном протоколе пробоподготовки в результате одностадийного выделения обеспечивает степень очистки ДНК гриба *F. graminearum*, необходимую для ПЦР-детекции этого фитопатогена. Увеличение объема наносимого элюата с 30 до 100 мкл (что должно было привести к повышению концентрации ингибиторов полимеразы в образце при условии их наличия в элюате) не снижало чувствительность и специфичность FLASH-ПЦР как при выделении ДНК из грибного мицелия, так и при выделении из образцов семян, зараженных фузариозом.

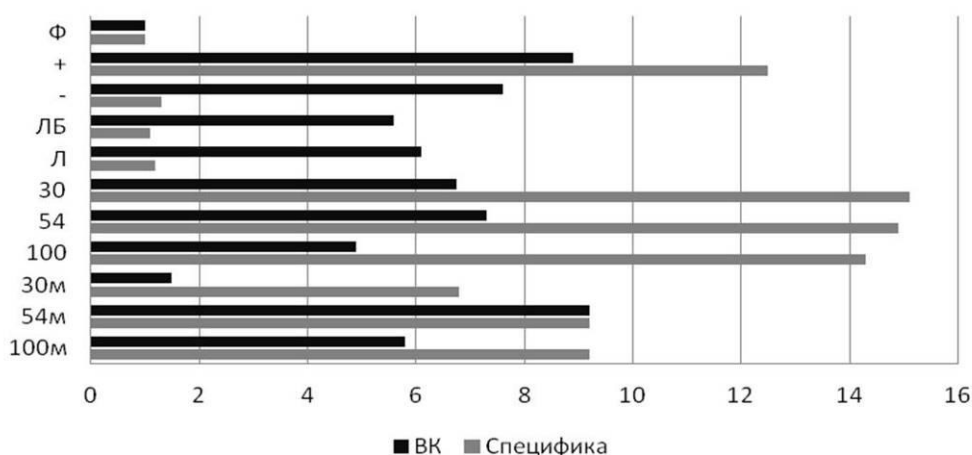


Рисунок 5.31 - Результаты FLASH-ПЦР элюатов, содержащих ДНК из мицелия *F. Graminearum*, полученных после выделения ДНК из грибного мицелия и из зараженных этим грибом семян пшеницы на картриджах с ФП-ПАНИ-сорбентом. По оси абсцисс отложена интенсивность флуоресценции, на оси ординат приведены обозначения исследованных образцов. Цифры «30, 54 и 100» обозначают объем лизата, наносимого на картридж, в мкл; буква «м» в обозначениях указывает, что ДНК выделяли из лизата мицелия гриба; буква «Л» обозначает неочищенный лизат; «ЛБ» - буферный раствор для лизиса, «-» - вода, «+» - положительный контроль; "Ф" – фоновый сигнал. Черные бары соответствуют результатам реакции с внутренним контролем, серые бары указывают на интенсивность специфического сигнала.

Выше уже упоминалось, что наряду с лизатами растительных тканей к биологическим образцам сложного состава следует отнести образцы цельной крови, сыворотки и плазмы, в различных количествах содержащие гем – ингибитор полимеразы. Кроме того, в крови содержатся другие ингибиторы ПЦР, а также большое количество белков (в плазме – до 10 % масс.), в том числе, нуклеаз и НК-связывающих белков, способных разрушать НК и/или выводить их из водной фазы в процессе фенольной экстракции. Предлагаемые различными компаниями наборы для выделения ДНК или РНК из крови либо не обеспечивают требуемой степени чистоты

выделяемого препарата НК (следовательно, в этих случаях необходима дополнительная очистка), либо их применение сопровождается существенными потерями выделяемой НК. Одной из целей проведенного исследования стала разработка универсального способа одностадийного выделения НК из образцов крови с помощью ПАНИ-содержащих сорбентов.

На Рисунке 5.32 приведены результаты выделения ДНК из лизатов цельной крови коровы и свиньи (протоколы лизиса образцов крови приведены в Главе 2). Препараты ДНК, полученные при пропускании лизатов цельной крови животных через картриджи с ПАНИ-содержащими сорбентами (полученными в присутствии неактивированного кремнезема), не содержали гем (отсутствовало поглощение при характеристических длинах волн) и были непосредственно пригодны для проведения ПЦР-анализа. Как и при выделении ДНК из растительных тканей, предварительное увлажнение сорбентов (в результате специально проводимого смачивания водой или буферным раствором, либо вследствие набивки картриджа суспензионным способом) не оказывало влияния на выход выделяемой ДНК. Это означает, что такая дополнительная манипуляция как увлажнение сорбента, не является необходимой в пробоподготовке.

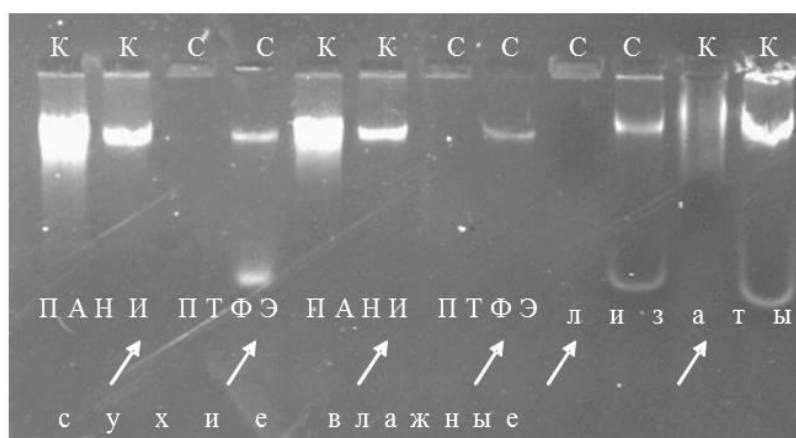


Рисунок 5.32 - Результаты электрофореза в 1 % агарозном геле образцов ДНК, полученных при пропускании лизатов цельной крови коровы (К) и свиньи (С) через картриджи с Si-500-ПТФЭ- и Si-500-ПАНИ-сорбентом. Сравнивали результаты выделения ДНК с помощью картриджей, заполненных суспензионным («влажные») и сухим («сухие») способами. Стрелками обозначены образцы лизатов, которые дополнительно центрифугировали (1 мин, 0.24 kg) перед нанесением на картриджи с сорбентами (в виду высокой вязкости получаемых лизатов с целью их частичного осветления).

Было установлено, что предварительное осветление лизатов (в результате их центрифугирования) способствует увеличению выхода ДНК только при

использовании ПТФЭ-содержащего сорбента (как при нанесении на сухой слой сорбента, так и при нанесении лизата на слой влажного сорбента). Если в результате использования ПАНИ-сорбента содержание ДНК в элюатах, полученных из неосветленных и осветленных лизатов, соответствовало содержанию ДНК в исходных лизатах, то при использовании картриджей с Si-500-ПТФЭ-материалом ДНК из неосветленных лизатов практически полностью удерживалась сорбентом. Этот факт можно объяснить высокой гидрофобностью и, следовательно, низкой смачиваемостью ПТФЭ-поверхности, в результате чего в слое сорбента быстро образуется вязкая пробка из компонентов лизата (агломерированных в частицы различного размера от сотен нм до долей мм), физически препятствующих проникновению высокомолекулярной ДНК через слой сорбента. Физическое удаление таких компонентов с одновременным уменьшением вязкости лизата в результате его осветления центрифугированием ожидаемо приводило к выделению ДНК, что подтверждается приведенной электрофореграммой (Рисунок 5.32).

Высокая степень очистки ДНК, выделяемой из образцов крови с помощью ПАНИ-содержащих материалов, подтверждена на примерах выделения ДНК из крови человека (с применением внутреннего контроля, разработанного компанией ЗАО НПФ «ДНК-Технология» для использования при амплификации фрагментов человеческой ДНК) и вирусной ДНК (ДНК фага Т4) из лизатов цельной крови и из модельных смесей, содержащих кровь с частицами фага Т4 (вирусные частицы добавляли перед лизисом) [356]. Кровь отбирали у добровольцев в стандартные пробирки с ЭДТА. Сравнивали результаты, полученные после проведения ферментативного (одно- и двухстадийного) лизиса, а также после термического лизиса образцов.

Для проведения ферментативного лизиса осаждали ядра лейкоцитов, отмывали их от дебриса и гемоглобина, а затем лизировали с помощью протеиназы или с помощью последовательной обработки протеиназой и лизоцимом. В результате этой процедуры в образце, предназначенном для лизиса, на порядок уменьшалось количество гемсодержащих веществ, однако значительные потери материала при отмывке снижали эффективность выделения ДНК при работе с малыми объемами образца. Термический лизис проводили после добавления к образцу цельной крови лизирующего буфера. В этой процедуре минимизированы потери материала, но сохраняется высокое содержание ингибиторов полимеразы в образце.

Лизаты пропускали через картриджи с Si-500-ПАНИ-сорбентом (получен на основе обработанного озоном кремнезема), а также выделяли другими методами,

использованными для сравнения. Полученные элюаты исследовали методом ПЦР в реальном времени. Результаты ПЦР с ДНК, выделенной с помощью ПАНИ-содержащего сорбента, сравнивали с результатами ПЦР после пробоподготовки с использованием набора «Проба-ГС» (ЗАО НПФ «ДНК-Технология») и с помощью мини-колонок NextGec GmbH (Германия). Также сравнивали время и число элементарных манипуляций, необходимых для выделения ДНК.

Средние значения характеристического цикла C_p и относительные концентрации ДНК в элюатах, определенные по кривым амплификации, представлены на Рисунке 5.33 (в случае амплификации фрагмента человеческого гена) и Рисунке 5.34 (в случае амплификации вирусной ДНК).

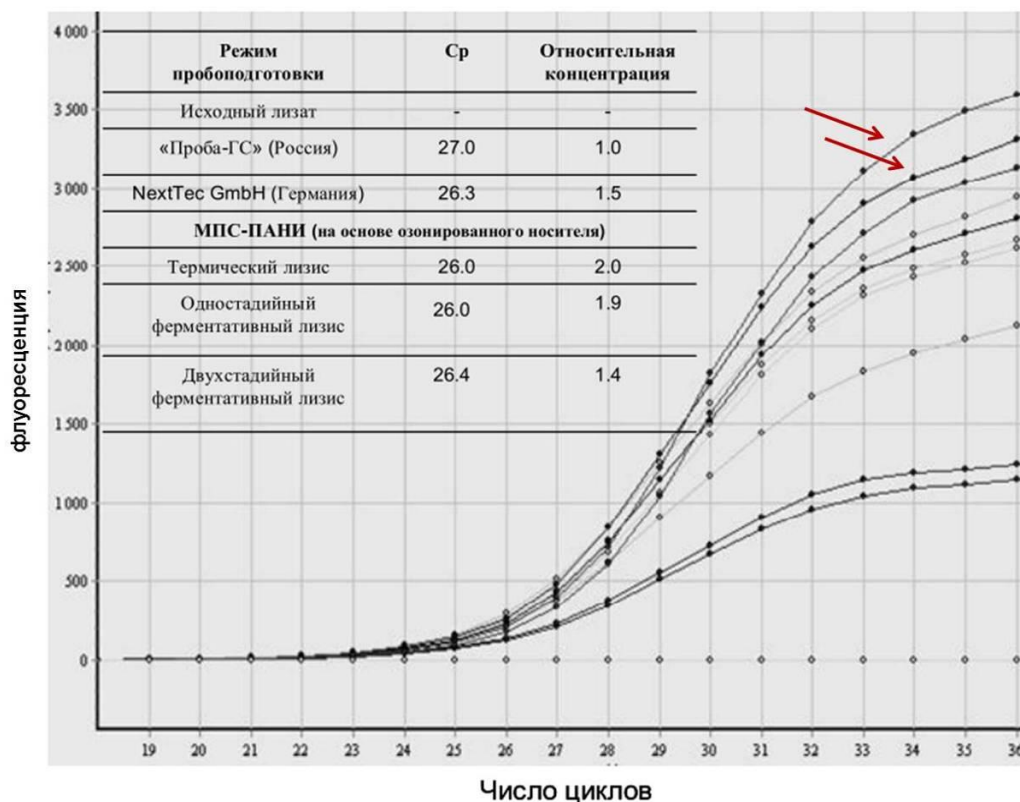


Рисунок 5.33 – Результаты амплификации фрагмента человеческой ДНК в ПЦР. Использовали внутренний контроль, разработанный в ЗАО НПФ «ДНК-Технология» для использования при амплификации фрагментов человеческой ДНК. Основные различия в протоколах пробоподготовки указаны в таблице на рисунке. Стрелки указывают на кривые амплификации, полученные с использованием ДНК, выделенной после термического лизиса образцов. C_p - значение характеристического цикла амплификации, автоматически определяемое программным обеспечением амплификатора. Относительная концентрация ДНК в образце $OK_{образца} = 2^{(C_p \text{ «Проба-ГС»} - C_p \text{ образца})}$ [382].

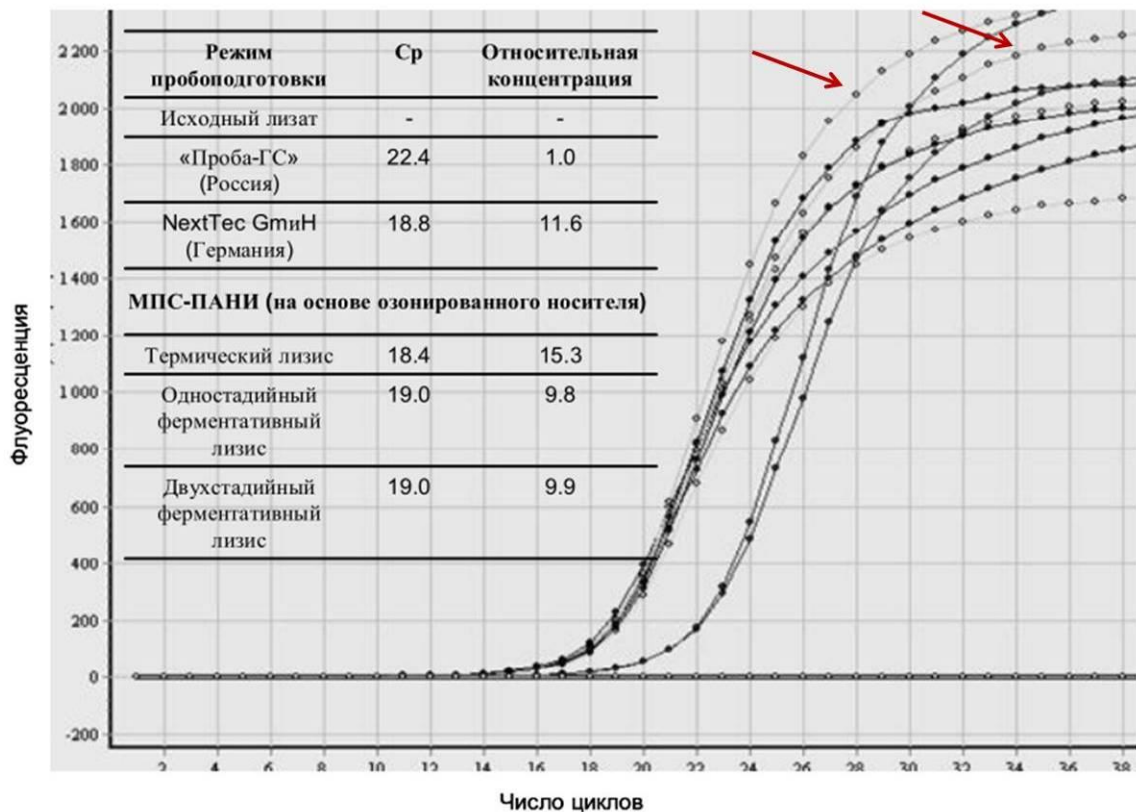


Рисунок 5.34 - Результаты амплификации фрагмента вирусной ДНК (фаг Т4) в ПЦР. Основные различия в протоколах пробоподготовки указаны в таблице на рисунке. Стрелки указывают на кривые амплификации, полученные с использованием ДНК, выделенной после термического лизиса образцов. Ср - значение характеристического цикла амплификации, автоматически определяемое программным обеспечением амплификатора. Относительная концентрация ДНК в образце $OK_{образца} = 2^{(Cp \text{ «Проба-ГС»} - Cp \text{ образца})}$ [382].

На Рисунке 5.35 приведена электрофореграмма препаратов ДНК, выделенных из лизатов образцов крови человека с помощью сравниваемых методов. Полученные результаты позволяют утверждать, что максимальная эффективность при выделении ДНК из образцов крови достигнута с помощью применения ФП-ПАНИ-сорбента после проведения термического лизиса образцов.

Сравнение временных затрат на проведение процедуры выделения ДНК также оказалось в пользу сочетания термического лизиса с последующим выделением с помощью спин-картриджа с ПАНИ-сорбентом. Так, процедура выделения с использованием набора «Проба-ГС» включает 20 последовательных манипуляций (и отнимает вместе с лизисом около 1 ч), в то время как пробоподготовка с помощью картриджа с ПАНИ-сорбентом, включая 8 манипуляций, отнимает в 2 раза меньше времени (при этом, что сам процесс выделения ДНК из полученного лизата требует всего 0.5 – 3 мин).

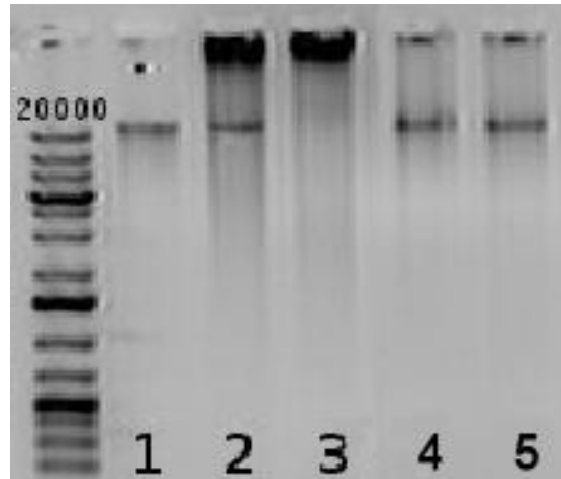


Рисунок 5.35 – Результаты электрофореза в 1 % агарозном геле элюатов, полученных после выделения ДНК из лизатов образцов крови с помощью различных методов. 1 – выделение с помощью набора «Проба-ГС»; 2 - выделение из лейкоцитарных ядер с помощью Si-500-ПАНИ-сорбента, 3 - выделение из лейкоцитарных ядер с помощью сорбента nexhtec™; 4 - 5 - выделение из лизата цельной крови (термический лизис) с помощью ФП-ПАНИ-сорбента.

Следующий пример одностадийного выделения ДНК человека с помощью ПАНИ-содержащих сорбентов позволяет предположить, что спектр применений материалов, демонстрирующих эффект «*негативной селекции*» в отношении НК, не ограничивается пробоподготовкой для ПЦР-диагностики, но может быть дополнен методами решения иных аналитических задач. Так, иногда требуется быстро определить наличие фрагментированных молекул ДНК в том или ином образце. Фрагментация ДНК происходит в результате различных биологических процессов, таких как, например, апоптоз клеток. Апоптоз также можно вызвать, воздействуя на клетки извне, например, обработав их определенной дозой УФ-излучения.

На Рисунке 5.36 представлена электрофореграмма ДНК-содержащих элюатов, полученных после пропускания через картриджи с ПАНИ-сорбентом лизатов клеток карциномы толстой кишки *Colon Carcinoma HT 29*. На те же клетки (в концентрации $1.4 \cdot 10^6$ клеток/мл) воздействовали УФ-излучением (30 Вт/см^2 , 2 мин), затем их лизировали, а полученный лизат также пропускали через картридж с ПАНИ-сорбентом. Параллельно ДНК из интактных и из обработанных УФ-излучением клеток выделяли методом фенол-хлороформной экстракции.

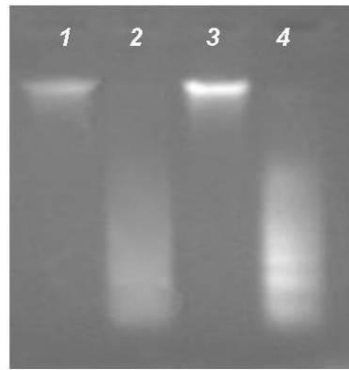


Рисунок 5.36 - Результаты электрофореза в 1 % агарозном геле ДНК-содержащих элюатов, полученных после выделения ДНК из лизата образца карциномы толстой кишки *Colon Carcinoma HT 29* методом фенол-хлороформной экстракции (дорожки 1 и 2) и с помощью сорбента МПС-1150-ПАНИ (дорожки 3 и 4); на дорожки 2 и 4 наносили аликвоты лизатов клеток, предварительно подвергнутых воздействию УФ-излучения [354].

Из приведенного рисунка следует, что выход ДНК после одностадийного выделения с помощью ПАНИ-сорбента не менее чем вдвое превышает выход ДНК после многостадийной процедуры фенол-хлороформной экстракции. Это заключение относится как к элюатам, полученным из интактных клеток, так и к препаратам, содержащим фрагментированную ДНК (вследствие УФ-обработки). Таким образом, практическое применение разработанных сорбентов оправдано и эффективно не только в ПЦР-диагностике, но также может быть рекомендовано при исследовании структурных изменений в молекулах НК.

5.1.4. Выделение суммарной фракции ДНК из почв

Поскольку образцы почв по сравнению с тканями эукариот являются еще более сложными и специфическими по составу объектами пробоподготовки при проведении ПЦР-диагностики, обсуждение результатов, полученных при исследовании эффективности применения разработанных сорбентов для выделения почвенной ДНК, выделено в отдельный подраздел диссертации. В настоящем исследовании предпринята попытка решить практическую задачу одностадийного выделения ДНК из такого «сложного» образца как почвенный экстракт. Современный мониторинг изменения микробиологического состава почв с целью выявления их деградации и наличия различных фитопатогенов (вирусной, бактериальной или грибковой природы) невозможен без применения методов молекулярной диагностики, в частности, ПЦР-анализа. Экстракцию ДНК из образцов почвы зачастую проводят

посредством лизиса микроорганизмов *in situ* с последующей очисткой ДНК. Выполнение этой задачи осложнено тем фактом, что около 60 % всех органических веществ почвы представляют собой гуминовые вещества (ГВ), являющиеся мощным ингибиторами полимеразы. Известные к настоящему моменту способы выделения ДНК из образцов почв, очищенной от ГВ, достаточно трудоемки и включают большое количество этапов. Одним из широко используемых протоколов является экстракция с использованием спин-колонок, заполненных силикагелем. Сначала ДНК и ГВ связываются кремнеземной матрицей, а затем удержанные примеси удаляются в результате проведения ряда последовательных этапов отмывки [405-407]. В работе [408] очистку ДНК осуществляли с использованием спин-картриджа, заполненного поли-N-винилпирролидоном. Как полагали авторы, этот прием позволяет очистить образец от фенолсодержащих ГВ. Тем не менее, оказалось, что чистота выделенной ДНК недостаточна, поэтому авторы ввели дополнительный этап очистки с использованием колонки, заполненной сефадексом G-75, что, по их мнению, должно было способствовать извлечению очищенной ДНК из различных типов почв.

В научной литературе часто обсуждаются методы очистки ДНК от ГВ, основанные на одновременном использовании разных типов сорбентов. Например, в работе [409] удаление ингибирующих примесей проводили в результате последовательного пропускания лизата образца почвы через стерильные шприцы, заполненные полиакриламидом, сефадексом G50 и сефадексом G-200.

Комплексное использование различных типов сорбентов для получения препаратов ДНК, очищенных от ингибиторов ПЦР, является, по-видимому, наиболее перспективным направлением развития методов ДНК-экстракции из почв. Система, в которой в качестве основного компонента используется универсальный носитель, может быть дополнена различными компонентами, применение которых адаптирует ее под решение текущей задачи. ПАНИ-содержащие сорбенты хорошо зарекомендовали себя при одностадийной очистке ДНК от различных (в первую очередь белковых) примесей. Можно предположить, что применение такого сорбента (поверхность которого не удерживает ДНК) в качестве базового компонента системы для экстракции ДНК из различных образцов почв обеспечит высокий выход и удовлетворительную степень очистки выделяемой ДНК.

Субстанции, входящие в состав ГВ, относятся к различным классам химических соединений и имеют сложную химическую и пространственную структуру. Обычно удается выделить несколько фракций ГВ: гуминовые кислоты (растворимые только в щелочной среде), фульвокислоты (растворимые в водных,

щелочных и кислых средах) и гумин (практически нерастворимый в водных, щелочных и кислых средах) [410]. Гуминовые кислоты и фульвокислоты являются мощными ингибиторами ДНК-полимеразы, и в настоящий момент не описано метода, с помощью которого можно быстро и эффективно очистить почвенную ДНК от указанных ингибиторов. Стоит отметить, что ряд коммерческих компаний предлагают различные наборы, разработанные с целью удаления ГВ из реакционной смеси [411]. При использовании таких наборов ДНК, гуминовые и фульвокислоты вначале удерживаются на кремнеземной матрице, после чего целевую ДНК отмывают от примесей и элюируют с сорбента.

В рамках настоящего исследования оценивали возможность эффективной сорбции ГВ (в частности, фракций гуминовых кислот и фульвокислот) на полиальгинатных частицах в сочетании с использованием ФП-ПАНИ-содержащего сорбента, не удерживающего молекулы ДНК. Достижимая в результате степень очистки должна была обеспечить возможность непосредственного проведения ПЦР-анализа.

Как известно, гуминовые кислоты, взаимодействуя с одновалентными катионами металлов (K^+ , Na^+), образуют водорастворимые соли, а в присутствии двухвалентных катионов (Ca^{2+} , Mg^{2+}) осаждаются. Гидрофильные фульвокислоты в присутствии двухвалентных катионов (Ca^{2+} , Mg^{2+}) образуют водорастворимые соли [412].

Ранее в работе [413] были выделены и исследованы с помощью ПААГ-электрофореза и эксклюзионной хроматографии 3 фракции (А, В, С+D) гуминовых кислот. Основываясь на приведенных в [413] данных, можно заключить, что в ряду А, В, С+D уменьшается как молекулярная масса, так и содержание ароматического углерода. Авторы [413] установили, что высокомолекулярные фракции обогащены жирными кислотами, полисахаридами и полипептидами, в то время как низкомолекулярные фракции содержат, в основном, производные лигнина [414, 415]. Очевидно, что выделяемые фракции гуминовых кислот содержат вещества с различными по химической природе функциональными группами, что определяет разнообразие их физико-химических свойств. Поэтому разработка методов очистки ДНК от примесей таких соединений, как правило, является сложной и трудоемкой задачей.

Можно ожидать, что одновременное использование полиальгинатных сфер, содержащих ионы кальция и потенциально способных осаждающих ГВ, с ФП-ПАНИ-содержащим сорбентом, поверхность которого не удерживает ДНК, позволит

осуществлять эффективное удаление фракций гуминовых кислот и фульвокислот из образцов почвенных лизатов, обеспечивая при этом возможность одностадийного выделения молекул ДНК.

Для экспериментальной проверки этого предположения фракции гуминовых и фульвокислот выделяли методом щелочной экстракции (как описано в [416]). Аликвоты полученных образцов, содержащих фракции ГВ, пропускали через слой разработанной двухкомпонентной системы, включающей ФП-ПАНИ-сорбент и полиальгинатные сферы (методика получения которых приведена в Главе 2). Полученные элюаты исследовали электрофоретически при постоянной силе тока (Рисунок 5.37).



Рисунок 5.37 - Результаты электрофореза в 10 % ПААГ (50 мА) фракций В и С гуминовых веществ. Линия 1 – раствор маркерных белков (сверху вниз: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 кДа, Thermo Scientific, #26619, США); линии 2, 3 - фракция В до и после очистки с использованием разработанной системы выделения; линии 4, 5 – фракция С+D до и после очистки с использованием разработанной системы. В каждую лунку наносили по 20 мкл исследуемых образцов.

Результаты электрофореза свидетельствуют о том, что, во-первых, в полученном экстракте обнаружены все три фракции гуминовых кислот (А, В, С+D), описанные в [413]. Во-вторых, разработанная композиция сорбционных материалов удерживает все гуминовые фракции, присутствующие в почвенном лизате.

Слой полиальгинатных частиц (сфер), по-видимому, удерживает большую часть фракции В, в то время как ПАНИ-сорбент удерживает как фракцию С, так и частично фракцию В за счет различных механизмов сорбции, включающих гидрофобное, ионное и диполь-дипольное взаимодействия. Этот вывод основан на

обсуждаемых выше результатах исследования механизма сорбции молекул различных биополимеров на поверхности ПАНИ-содержащих сорбентов (Глава 4).

Исходную смесь ГВ и элюат, собранный после пропускания смеси через картридж с разработанными сорбентами, анализировали в обращено-фазовом режиме ВЭЖХ (Рисунок 5.38).

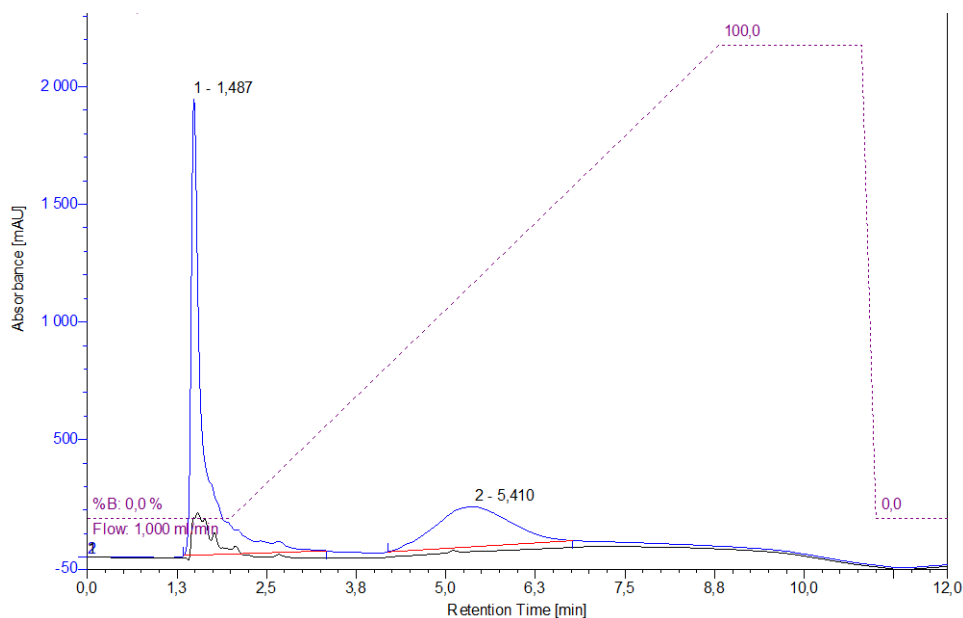


Рисунок 5.38 - Хроматограммы исходной и очищенной смесей. Синяя хроматограмма соответствует исходному раствору ГВ. Черная хроматограмма соответствует элюату, полученному с использованием комбинации разработанных сорбентов. Хроматографию проводили с использованием Dionex Ultimate 3000 (ThermoFisher Scientific, США) на колонке YMC-Pack C4 100 x 4.6 мм в условиях градиентного элюирования. Объем пробы составлял 50 мкл. Исследование проводили при длине волны 214 нм и скорости потока 1 мл/мин.

Из Рисунка 5.38 следует, что в исследуемом препарате присутствуют как гидрофильная фракция (поскольку временной интервал выхода пика составил 1 - 3 мин), так и частично гидрофобная фракция (интервал времени выхода соответствующего пика составил 4 - 7 мин). На Рисунке 5.39 представлены структуры гидрофобных пиков, выделенных с колонок YMC-Pack C4 и YMC-Pack C18, полученные с помощью диодно-матричного детектора. Сравнение полученных тепловых карт позволяет предположить, что пик, соответствующий гидрофобной фракции, содержит смесь различных веществ. Это особенно четко проявляется после использования колонки с более гидрофобной фазой (C18), поскольку спектры поглощения в диапазоне от 200 до 320 нм, представленные на соответствующей тепловой карте, различаются.

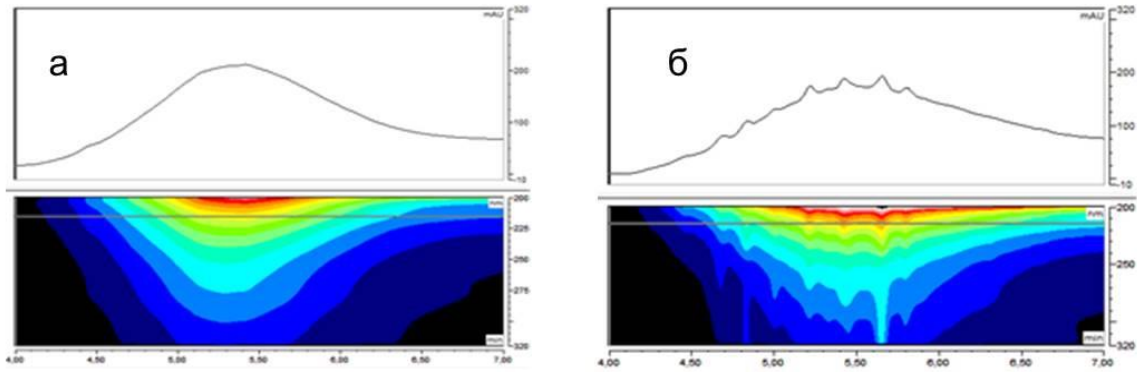


Рисунок 5.39 - Сравнение гидрофобных пиков, полученных с помощью системы Dionex Ultimate 3000 (ThermoFisher Scientific, США) с диодно-матричным детектором на колонках YMC-Pack C4, 100 x 4.6 мм (слева) и YMC-Pack C18, 100 x 4.6 мм (справа). Тепловая карта отражает изменения значений оптической плотности при различных длинах волн (переход от черного цвета к красному указывает на повышение оптической плотности).

Следует отметить, что результаты хроматографии приведены для образца, полученного в результате щелочной экстракции ($\text{pH} \sim 12$) в течении 4 ч при 60°C . Очевидно, что значения оптической плотности, полученные при анализе неочищенного экстракта, соответствуют высокой концентрации ГВ в образце. На практике при проведении стандартной процедуры выделения ДНК из образцов почвы такое высокое количество ГВ в образце (~ 2000 mAU для гидрофильной фракции) обычно не достигается вследствие более низких значений pH в лизирующем буферном растворе, а также из-за более низких температуры и времени термообработки. Несмотря на это, двухкомпонентный сорбент продемонстрировал высокую эффективность при удерживании ГВ. Гидрофобная фракция была полностью удержана сорбентом, а эффективность сорбции гидрофильной фракции составила $\sim 95\%$ (определяли среднее значение отношения площадей пиков исходного и очищенного образца по трем измерениям). Полученные данные позволяют говорить о высокой эффективности удерживания ГВ разработанным двухкомпонентным сорбентом с сохранением способности не удерживать ДНК за счет эффекта «*негативной селекции*» по отношению к НК.

Очевидно, что почвы различаются как минералогическим и органическим составом, так и составом нано-, микро-, макрофауны и флоры. Таким образом, в образцах почв, относящихся к различным типам, могут присутствовать НК различного происхождения, а оптимальные условия выделения НК из таких образцов будут определяться природой организма-источника НК. Для подтверждения эффективности применения разработанного ФП-ПАНИ/полиальгинатного сорбента

для очистки ДНК-содержащих образцов от примесей ГВ и с целью демонстрации принципиальной пригодности разработанной системы для выделения ДНК из образцов почвы проводили следующую процедуру. Лизировали навески почвы, содержащие предварительно внесенную ДНК из клеток яичника китайского хомячка по протоколу, описанному в Главе 2. Лизат очищали на картридже с разработанным комбинированным сорбентом. При проведении ПЦР использовали набор resDNASEQ™ Quantitative CHO DNA Kit (Applied Biosystems, USA). Полученные кривые амплификации приведены на Рисунке 5.40.

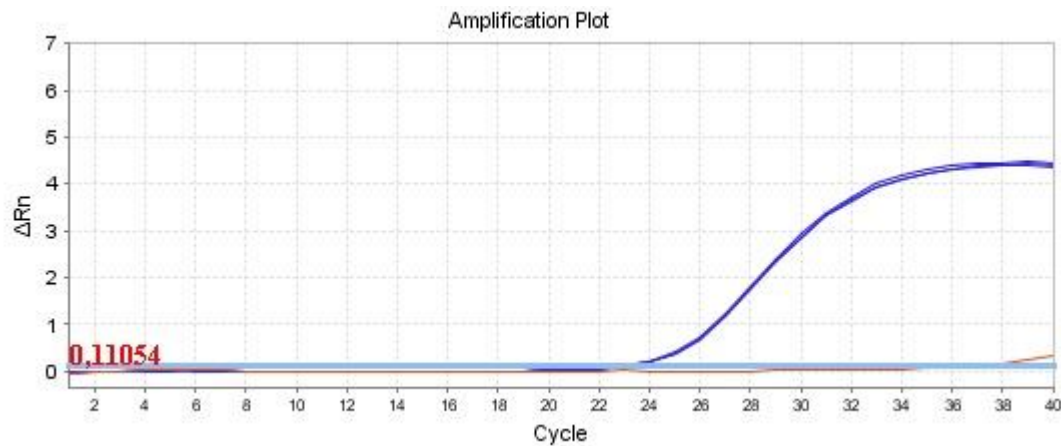


Рисунок 5.40 - Результаты ПЦР в реальном времени. Кривая амплификации образца до пропускания через двухкомпонентную систему, показана на графике коричневым цветом. Она практически совпадает с фоновым сигналом (голубая кривая). Синие кривые амплификации соответствуют элюатам, полученным после выделения и очистки ДНК с помощью разработанной системы.

Результаты ПЦР-анализа подтверждают, что разработанный двухкомпонентный ФП-ПАНИ/полиальгинатный сорбент эффективно очищает выделяемую ДНК от примесей, ингибирующих *Taq*-полимеразу, в частности, от ГВ.

Таким образом, в настоящем исследовании разработана и успешно протестирована новая двухкомпонентная биосепарирующая система. Компоненты этой системы (ФП-ПАНИ-сорбент и полиальгинатные сферы) эффективно удерживают ГВ при одностадийном выделении ДНК из реальных образцов почвы. Представленная разработка способна конкурировать с предлагаемыми на рынке коммерческими аналогами за счет простоты применения, относительно низкой стоимости и высокой скорости выделения ДНК. Вследствие реализации эффекта «негативной селекции» по отношению к ДНК и благодаря свойству эффективно удерживать ГВ, разработанная система перспективна для проведения анализа микробиологического состава почв.

5.2. Очистка синтетических олигонуклеотидов и ПЦР-фрагментов

Столь разные по химическому составу материалы, разработанные в настоящем исследовании, объединены общим свойством – они демонстрируют эффект «негативной селекции» в отношении НК. При исследовании сорбционных свойств разработанных сорбентов в отношении биополимеров (Глава 3) было показано, что это свойство проявляется в различной степени в зависимости от химического состава полимерных модификаторов, использованных при получении сорбентов. Можно ожидать, что степень удерживания НК, различающихся вторичной структурой (от «нулевой» сорбции до полного удерживания), будет зависеть от присутствия на поверхности полимерных покрытий *дополнительно* вводимых функциональных групп, что может быть использовано при разработке эффективных протоколов разделения смесей таких НК (либо для дополнительной очистки отдельных фракций НК).

Чтобы подтвердить это предположение, сравнивали результаты удерживания *днДНК*, *онДНК* и РНК при пропускании их модельных смесей через картриджи с разработанными фторполимерсодержащими сорбентами с различной полярностью поверхности. В качестве таких сорбентов использовали предварительно обработанные озоном кремнеземы, модифицированные сополимерами ТФЭ с гексафторпропиленом (ГФП), с аллиламином (АА) или с аллиловым спиртом (АС), а также взятый для сравнения Si-500-ПТФЭ-ГФП-сорбент, полученный по радиационной технологии. С помощью картриджей, содержащих перечисленные материалы, проводили одностадийное выделение *днДНК* и РНК из бактериальных лизатов *A. tumefaciens C58* (Рисунок 5.41), *онДНК* из модельных растворов (Рисунок 5.42) и компонентов смеси фрагментированной *днДНК* (Рисунок 5.43).

Как и следовало ожидать, бактериальная РНК (Рисунок 5.41) и синтетические одонитевые олигонуклеотиды (Рисунки 5.41 и 5.42) удерживались тестируемыми сорбентами в различной степени.

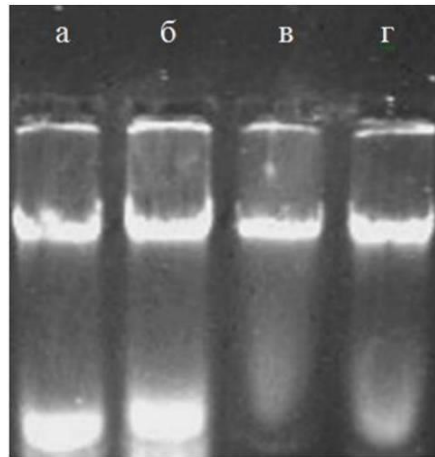


Рисунок 5.41 – Электрофореграмма (0.8 % агарозный гель) элюатов, полученных после пропускания лизатов *A. tumefaciens* C58 через картриджи с ПТФЭ-содержащими сорбентами: а - исходный лизат; б - г - элюаты, полученные после пропускания лизата через картриджи, содержащие Si-500-ПТФЭ-ГФП (б), Si-500-ПТФЭ-АА (в) и Si-500-ПТФЭ-АС (г).

Из приведенных рисунков следует, что при использовании ПТФЭ-содержащих сорбентов выход НК изменялся в зависимости от полярности поверхности сорбента. Удерживание *он*ДНК и РНК возрастало в ряду ПТФЭ-ГФП – ПТФЭ-АС – ПТФЭ-АА (с поверхностной концентрацией аминогрупп около 25 мкмоль/г сорбента). В то же время, выход *дн*ДНК повышался при использовании сорбента, содержащего гидроксильные группы, по сравнению с материалом, модифицированным сополимером, содержащим звенья АА. Выход *дн*ДНК оценивали, используя раствор 1 кб ДНК-маркера (Gene Ruler™, Fermentas, США), взятый в качестве модельной смеси, содержащей фрагменты ДНК различной длины. Из Рисунка 5.42 видно, что материал, модифицированный ПТФЭ-АА с высокой концентрацией аминогрупп (около 280 мкмоль/г сорбента), эффективно удерживает даже относительно высокомолекулярные двунитевые фрагменты ДНК. В то же время, удерживание таких фрагментов сорбентами, модифицированными ПТФЭ-ГФП, как и ожидалось, было незначительным как в случае материалов, полученных с использованием озон-индуцированной технологии, так и при использовании радиационной технологии.

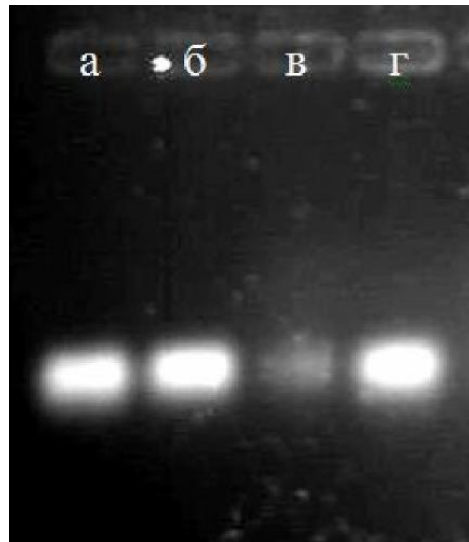


Рисунок 5.42 – Результат пропускания короткого олигонуклеотида (ADA-primer, Proligo GmbH, Германия) через картриджи с ПТФЭ-содержащими сорбентами (электрофореграмма в 0.8 % агарозном геле): а - раствор олигонуклеотида перед нанесением на картридж; б - г - элюаты, собранные после пропускания раствора через картриджи с сорбентами - Si-500-ПТФЭ-ГФП (б), Si-500-ПТФЭ-АА (в) и Si-500-ПТФЭ-АС (г).

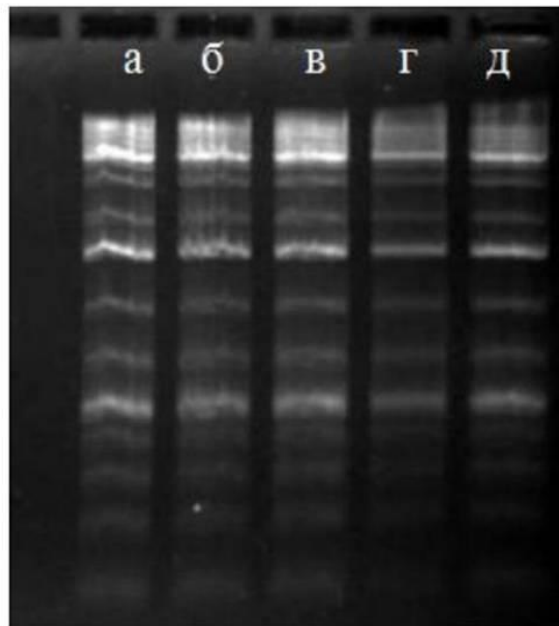


Рисунок 5.43 - Результат пропускания смеси фрагментов *днДНК* через картриджи с ПТФЭ-содержащими сорбентами (электрофореграмма в 0.8 % агарозном геле): а - смесь фрагментов ДНК (Gene Ruler™, Fermentas, США) перед нанесением; б - элюат, полученный после пропускания через картридж с Si-500-ПТФЭ-ГФП-сорбентом, полученным по радиационной технологии; в – д – элюаты, полученные после пропускания смеси через картриджи с сорбентами, полученными на основе кремнезема, обработанного озоном: Si-500-ПТФЭ-ГФП (в), Si-500-ПТФЭ-АА с концентрацией поверхностных аминогрупп 280 мкмоль/г сорбента (г) и Si-500-ПТФЭ-АС (д).

Для оценки степени очистки ДНК, выделенной при пропускании через слой сорбента лизата бактериальной культуры *A. tumefaciens* C58, отобранные элюаты тестировали методом ПЦР в реальном времени. Выход ДНК, выделенной с использованием сорбента, модифицированного ПТФЭ-ГФП (полученного с применением радиационной технологии), принимали за 100 %. Полученные результаты представлены в Таблице 5.13. Эффективность амплификации ПЦР-фрагментов оценивали, сравнивая значения C_p . Полученные результаты свидетельствуют о том, что выход очищенной ДНК в собранных элюатах при использовании ПТФЭ-ГФП-содержащего сорбента в среднем вдвое превышал выход ДНК при использовании материалов, модифицированных сополимерами ТФЭ с АА и с АС. Однако все три модификации ПТФЭ-содержащего сорбента обеспечивали выход очищенной ДНК, непосредственно пригодной для проведения ПЦР-анализа.

Таблица 5.13 - Выход ПЦР-фрагментов бактериальной ДНК, выделенной с помощью ПТФЭ-содержащих сорбентов.

Материал	Флуоресцентная проба (Fam)		Концентрация ПЦР-продукта	
	C_p	станд. откл., %	концентрация, %	станд. откл., %
Si-500-ПТФЭ-ГПФ (радиационная технология)	19.5	0.1	100	0.8
Si-500-ПТФЭ-ГПФ (озонированный носитель)	19.5	0.5	100	0.9
Si-500-ПТФЭ-АА (озонированный носитель)	20.6	0.4	71.2	2.3
Si-500-ПТФЭ-АС (озонированный носитель)	20.3	0.4	87.5	2.9

Таким образом, технология получения ПТФЭ-содержащих композитов на основе обработанных озоном кремнезёмов (Глава 4), обеспечивает преимущества при разделении смесей НК, различающихся вторичной структурой. Разработанная технология получения композиционных сорбентов на основе кремнезёма, обработанного озоном, пригодна для создания материалов, обеспечивающих эффективную одностадийную очистку *днДНК*. Получаемые при этом ДНК-содержащие элюаты могут непосредственно использоваться в ПЦР-анализе. Очевидно, что разработанная технология обеспечивает возможность получения

сорбентов с различной полярностью поверхности и с различной степенью гидрофильности, которые пригодны, например, для разделения НК, различающихся вторичной структурой.

В подразделе 5.1.3 был рассмотрен случай экспресс-визуализации результата фрагментации ДНК человека, наступившей в процессе УФ-индуцированного апоптоза, с помощью ПАНИ-содержащего сорбента. Такое проявление эффекта «*негативной селекции*», т. е. не удерживания молекул ДНК вне зависимости от их массы, может оказаться полезным в процедурах очистки синтетических олигомеров (ампликонов), получаемых в результате ПЦР. Очистка ПЦР-фрагментов необходима, например, при проведении прямого секвенирования ПЦР-продуктов - исключительно чувствительного метода выявления мутаций.

Одной из проблем, которую приходится решать при секвенировании продуктов амплификации, является присутствие значительного количества дНТФ и олигонуклеотидных праймеров, которые не были использованы в ходе ПЦР. Как правило, в ПЦР расходуется не более 10 % праймеров, а их избыток переносится в следующую реакцию. Эти «избыточные» праймеры конкурируют за места отжига с секвенирующими праймерами, связывают полимеразу, а также расходуют δ - и $\delta\delta$ НТФ (последние используются для терминации секвенирования). В результате качество секвенирования ПЦР-фрагментов снижается [417].

Вместе с ПЦР-фрагментами в реакцию секвенирования также переносится избыток дНТФ. Обычно концентрация дНТФ (для каждого нуклеотида) в составе реакционной смеси при проведении ПЦР составляет 0.02 мМ, и только около 3 % этого количества расходуется после 25 циклов реакции. Чтобы достичь необходимых для эффективного секвенирования соотношений δ НТФ/ $\delta\delta$ НТФ, пришлось бы добавлять в реакцию настолько много $\delta\delta$ НТФ, что проведение рутинных исследований стало бы невозможным в силу чрезвычайного увеличения их стоимости.

Таким образом, эффективное прямое секвенирование ПЦР-продуктов возможно только после удаления из смеси избытка праймеров и дНТФ, остающихся после завершения ПЦР. В литературе описано довольно много различных способов очистки ПЦР-продуктов, основанных, например, на различиях в молекулярных массах дНТФ, праймеров и ПЦР-фрагментов, осуществляемых за счет осаждения полиэтиленгликолем или изопропанолом, либо в результате ультрафильтрации. Другие методы основаны на ферментативном расщеплении *он*ДНК, не затрагивающем *дн*ДНК, или на ферментативном разрушении дНТФ и праймеров. Если в результате ПЦР образуются гетерогенные молекулы ДНК, то для их очистки используют

хроматографические методы или электрофорез (в ПААГ и в агарозном геле). С этой целью применяют дополнительное (часто дорогостоящее) оборудование. После электрофореза необходимые ДНК-фрагменты выделяют из геля любыми доступными методами (элюцией из геля, сорбцией на магнитных или аффинных частицах из расплава геля и др.). Иногда применяют специально сконструированные устройства, в которых реализуется все перечисленные приемы. Эти методы описаны в различных практических руководствах и обзорах (например, в [417, 418]) и, как правило, представляют собой многостадийные трудоемкие процедуры, нередко сопровождающиеся потерей выделяемого продукта на каждой стадии.

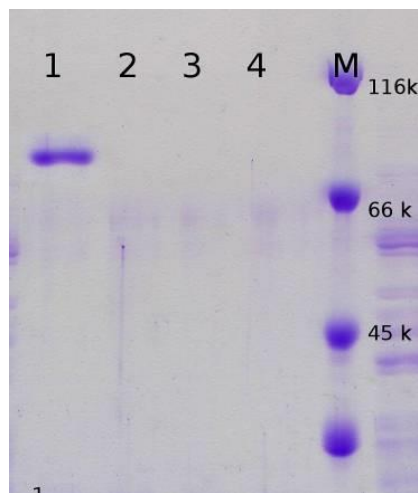


Рисунок 5.44 - Результаты электрофореза в 10 % ПААГ. Гель окрашивали Кумасси R-250. 1 – исходный *Taq*-полимеразы; 2 – 4: элюаты, полученные после использования Si-500-ФП-ПАНИ-, Si-500-ПАНИ- и nexttec™ 1-Step-сорбентов, соответственно. М – маркер молекулярной массы (Unstained Protein Molecular Weight Marker, FERMENTAS, США).

В настоящем исследовании была проведена оценка эффективности применения некоторых из разработанных сорбентов для одностадийной очистки ПЦР-фрагментов от полимеразы, избыточных дНТФ, праймеров и зондов. С целью очистки ПЦР-фрагментов от *Taq*-полимеразы раствор фермента (4.25 мг в 50 мкл) пропускали через картриджи с Si-500-ФП-ПАНИ-сорбентом, Si-500-ПАНИ-сорбентом (полученном в присутствии неактивированного кремнезема) и через колонки nexttec™ 1-Step. Элюаты анализировали спектрофотометрически (при $\lambda = 280$ нм) и электрофоретически в ПААГ. Полученные данные (Рисунок 5.44 и Таблица 5.14) подтвердили, что *Taq*-полимераза эффективно удерживается всеми исследованными материалами, а наибольшее удерживание демонстрирует Si-500-ФП-ПАНИ-сорбент. Следует отметить, что реакционная смесь для проведения ПЦР, как правило,

содержит на порядок меньше полимеразы по сравнению с ее содержанием в модельном растворе, использованном в исследовании.

Таблица 5.14 - Оптическое поглощение образцов *Taq*-полимеразы при 280 нм до и после пропускания через картриджи с различными сорбентами.

Образец	A ₂₈₀	Удерживание белка, %
исходный раствор	0.105	-
Si-500-ФП-ПАНИ-сорбент	0.005	95.2
Si-500-ПАНИ-сорбент	0.010	90.5
nexttec™ 1-Step-сорбент	0.007	93.3

Еще важнее было показать, что с помощью картриджей с ПАНИ-содержащими сорбентами может быть проведена эффективная одностадийная очистка ПЦР-фрагментов от избытка дНТФ. Для этого через картриджи с Si-500-ФП-ПАНИ-сорбентом, Si-500-ПАНИ-сорбентом (полученном в присутствии неактивированного кремнезема), Si-500-изо-ПСК-ПАНИ-сорбентом и через колонки nexttec™ 1-Step пропускали по 50 мкл эквимольной смеси дНТФ (250 мкмоль/л): дАТФ, дЦТФ, дГТФ, дТТФ и α³²P-дАТФ (с радиоактивной меткой). Полученные элюаты анализировали с помощью сцинтилляционного счетчика Wizard counter (Amersham Pharmacia, Швеция), регистрируя число импульсов в мин. (Таблица 5.15).

Таблица 5.15 - Удерживание дНТФ исследованными сорбентами.

Сорбент	Импульсов/мин, в элюате	Удерживание дНТФ (%)
	Элюат	
Si-500-ФП-ПАНИ-	45 714	83.6
nexttec™ 1-Step	58 544	79.0
Si-500-ПАНИ-	87 048	68.7
Si-500-изо-ПСК-ПАНИ-	129 112	53.6
смесь до нанесения	278 346	-

Из полученных результатов следует, что Si-500-ФП-ПАНИ-сорбентом удерживается около 85 % нанесенных дНТФ - это наилучший показатель по сравнению с другими исследованными материалами.

Было показано, что ПАНИ-содержащие материалы одновременно пригодны для эффективной очистки ПРЦ-фрагментов от избытка олигонуклеотидов и молекул зонда. Удерживание молекул олигонуклеотидов оценивали по результатам FLASH-

ПЦР. В качестве матрицы для проведения ПЦР использовали фрагмент ДНК длиной 560 п. о. В качестве внутреннего контроля брали праймеры и HEX-меченный зонд (0.33 пмоль/мкл). После завершения ПЦР в смесь добавляли FAM-меченый олигонуклеотид FAM-AGC CGG GCG CGG TGG C (1 пмоль/мкл). Полученную смесь пропускали через картриджи с Si-500-ФП-ПАНИ-сорбентом, с МПС-1150-ПАНИ-сорбентом и через колонки из набора nexotec™1-Step. Готовили разведения полученных элюатов в 100, 50 и в 10 раз и определяли уровень флуоресценции с помощью флуориметра «Джин» (ЗАО НПФ «ДНК-технология», Россия). Результаты приведены на Рисунке 5.45. Дополнительно сравнивали содержание ПЦР-фрагментов в полученных элюатах по результатам электрофореза в агарозном геле (Рисунок 5.46).

Образец	Результат	Специфика	ВК	Образец	Результат	Специфика	ВК
0.	+	307,00	142,00	4.	нк	1,31	1,12
0.10	+	139,00	17,30	4.10	нк	0,92	0,98
0.50	+	20,50	3,85	4.50	нк	1,00	0,98
0.100	+	8,08	2,44	4.100	нк	0,92	0,98
1.	+	25,80	3,27	4.1w	нк	0,85	1,07
1.10	+	2,62	1,12	5.	+	3,62	1,61
1.50	нк	1,31	0,93	5.10	нк	1,08	1,02
1.100	нк	1,08	0,93	5.50	нк	0,92	1,07
1.w	?	1,77	1,51	5.100	нк	0,85	0,93
2.	+	20,40	4,05	5.w	нк	0,85	0,88
2.10	+	2,23	1,27	6.	нк	1,23	1,61
2.50	нк	1,15	1,07	6.10	нк	1,08	0,98
2.100	нк	0,92	0,98	6.50	нк	1,00	0,98
2.w	+	2,23	1,07	6.100	нк	0,85	0,98
3.	нк	1,08	1,07	6.w	нк	0,92	0,98
3.10	нк	0,85	0,88	фон	фон	0,92	1,02
3.50	нк	0,77	0,93	фон	фон	1,08	0,98
3.100	нк	0,85	0,93				
3.w	нк	1,00	0,98				

* Нормировочные значения
 Примечание: FAM-olig, HEX-fluorofor
 13,00* 20,50*
 ДНК-Технология

Рисунок 5.45 - Эффективность удерживания олигонуклеотидов и зондов после пропускания через различные сорбенты. 0 – смесь до нанесения на картриджи; 1 - 6 - элюаты после очистки смеси следующими сорбентами: 1 - Si-500-ПАНИ-сорбент (неактивированный носитель); 2 - Si-500-ФП-ПАНИ-сорбент; 3 – сорбент из набора nexotec™ 1-Step; 4 - МПС-1150-ПФБД-сорбент; 5 - Si-500-изо-ПСК-ПАНИ-сорбент, 6 - Si-500-ПАНИ-сорбент (носитель обработан озоном). Цифры в обозначениях дорожек на геле соответствуют разбавлению элюата: X - без разбавления; X.10 - разбавление в 10 раз; X.50 - разбавление в 50 раз; X.100 - разбавление в 100 раз. W – пробу получали в результате повторной элюции с сорбента деионизованной водой.

Сравнение представленных результатов ПЦР и электрофореза показало, что все разработанные ПАНИ-содержащие сорбенты не удерживают ПЦР-фрагменты (напротив, удерживание происходило при использовании фторполимерсодержащего

сорбента и сорбента из набора nexttec™ 1-Step), однако наиболее эффективная очистка от олигонуклеотидов происходила при использовании ФП-ПАНИ-содержащего материала и сорбента, полученного в результате полимеризации анилина в присутствии неактивированного кремнезема.

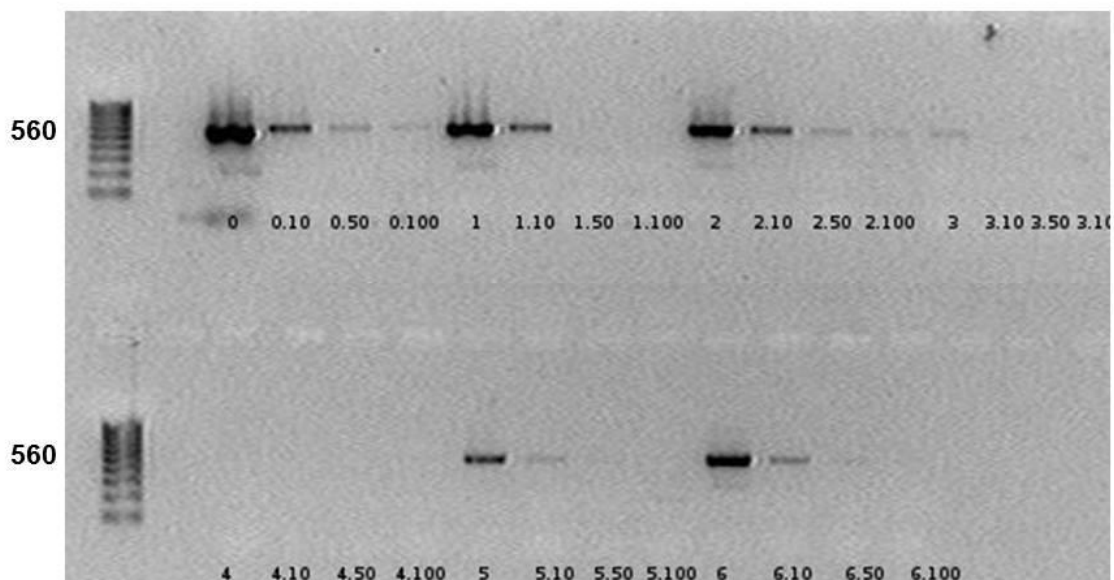


Рисунок 5.46 - Результаты электрофореза в 2 % агарозном геле ПЦР-фрагментов, очищенных от олигонуклеотидов и зондов на картриджах с различными сорбентами. 0 - смесь до очистки; 1 - 6 - элюаты после очистки смеси следующими сорбентами: 1 - Si-500-ПАНИ-сорбент (неактивированный носитель); 2 - Si-500-ФП-ПАНИ-сорбент; 3 – сорбент из набора nexttec™ 1-Step; 4 - МПС-1150-ПФБД-сорбент; 5 - Si-500-изо-ПСК-ПАНИ-сорбент, 6 - Si-500-ПАНИ-сорбент (носитель обработан озоном). Цифры в обозначениях дорожек на геле соответствуют разбавлению элюата: X - без разбавления; X.10 - разбавление в 10 раз; X.50 - разбавление в 50 раз; X.100 - разбавление в 100 раз.

Таким образом, композиционные сорбенты, модифицированные фторполимерами и ПАНИ, оказываются весьма эффективными материалами при их использовании в биосепарации, прежде всего в протоколах одностадийного выделения НК из различных биологических источников для непосредственного проведения ПЦР-диагностики. Кроме того, благодаря эффекту «*негативной селекции*» в отношении *днДНК*, разработанные ПАНИ-содержащие материалы можно с успехом применять в смежных областях молекулярной диагностики, в частности, при одностадийной очистке ПРЦ-фрагментов перед секвенированием. Эффективность использования разработанных полимерсодержащих композитов в некоторых других областях нанобиотехнологии подтверждается результатами, обсуждаемыми в заключительных подразделах Главы 5.

5.3. Применение ФП-модифицированных композитов в качестве носителя для твердофазного синтеза олигонуклеотидов

В предыдущих подразделах диссертации обсуждались результаты использования разработанных композитов, демонстрирующих эффект «негативной селекции» в отношении НК, для разделения компонентов смесей, содержащих биополимеры, относящиеся к различным классам соединений либо относящихся к одному классу, но различающихся вторичной структурой. В частности, было показано, что введение дополнительных функциональных групп в состав фторполимерных покрытий не только улучшает их смачиваемость (в результате чего повышается эффективная емкость таких материалов), но также открывает возможности для иммобилизации различных биомолекул. Прямой синтез фторсодержащих полимеров с необходимыми функциональными группами часто сопряжен с технологическими трудностями, поскольку проводится при повышенном или пониженном давлении, в среде специальных растворителей с добавлением инициаторов, эмульгаторов и т.п. В главе 1 в качестве примеров были описаны способы получения фторполимерных покрытий на твердых носителях с использованием радиации.

Способы получения фторполимерсодержащих носителей, основанные на формировании тонкого нерастворимого полимерного покрытия методом «кастинга» из раствора полимера представляются более технологичными. Данные, полученные при исследовании сорбционных свойств фторполимерсодержащих сорбентов в отношении НК, позволяют предположить, что в результате использования кремнеземов, покрытых нанотолщинным слоем фторсодержащего полимера в качестве носителя для твердофазного синтеза олигонуклеотидов, будет снижена неспецифическая сорбция синтезированных олигонуклеотидов при их отделении от носителя (следовательно, будет достигнуто повышение выхода продукта). Для этого фторполимерное покрытие должно содержать якорные группы, позволяющие проводить иммобилизацию нуклеозидных остатков.

Чтобы убедиться в правильности сделанного предположения, на кремнеземные частицы методом «кастинга» наносили покрытия образцов фторсодержащих полимеров (любезно предоставленных компанией Du Pont, США), в частности, поли(1,2,2-трифтор-1-[[1,1,2,3,3,3-гексафтор-2-[1,1,2,2-тетрафтор-2-(фторсульфонил)этокси]пропокси]бутан-1,4-дила) (“PFOB”) из его раствора в трифтортрихлорэтаноле (хладон R-113) и поли{1,2,2-трифтор-1-[1,1,2,2,3,4,4,4-

октафтор-3-(1,1,2,2-тетрафтор-3-метокси-3-оксопропокси) бутокси] бутан-1,4-диила} (“*EVE*”) из его раствора в ацетоне. Присутствие реакционноспособных эфирных групп в структурах указанных фторсодержащих полимеров (Рисунок 5.47) позволяет проводить полимераналогичные реакции, в результате которых удается иммобилизовать биолиганды. Доступность иммобилизованных лигандов обеспечивается спейсерными группами, в качестве которых выступают боковые группы полимера на поверхности носителя. В результате получали материал с фторсодержащей поверхностью, характеризующейся низким уровнем неспецифической сорбции, а наличие спейсеров обеспечивало экспонирование биолиганда (нуклеозидного остатка) с поверхности носителя в объем реакционной смеси, что повышало его доступность для реагентов.

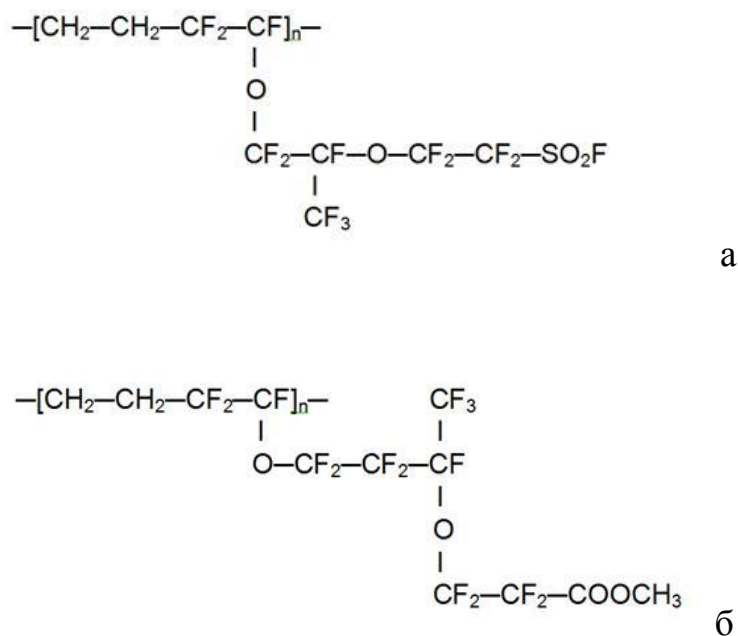


Рисунок 5.47 – Химические структуры фторсодержащих полимерных модификаторов: а) - поли(1,2,2-трифтор-1-{1,1,2,3,3,3-гексафтор-2-[1,1,2,2-тетрафтор-2-(фторсульфонил)этокси]пропокси}бутан-1,4-диил) (“*PFOB*”); б) - поли{1,2,2-трифтор-1-[1,1,2,2,3,4,4,4-октафтор-3-(1,1,2,2-тетрафтор-3-метокси-3-оксопропокси)бутокси]бутан-1,4-диила} (“*EVE*”).

На Рисунке 5.48 в качестве примера представлена схема обработки кремнеземного материала с *EVE*-покрытием с целью получения нуклеозидсодержащего носителя для твердофазного синтеза олигонуклеотидов. *EVE*-материал предварительно обрабатывали соляной кислотой, а все последующие стадии модифицирования *EVE*- и *PFOB*-содержащего материалов проводили аналогичным образом. Материалы последовательно обрабатывали *N,N'*-карбонилдиимидазолом (для

активирования карбоксильных групп) и гексаметилендиамином (для аминирования активированной поверхности), а затем нуклеозидом DMT-dT-SNPE (Proligo GmbH, Германия) в присутствии триэаноламина в *N,N*-диметилформамиде.

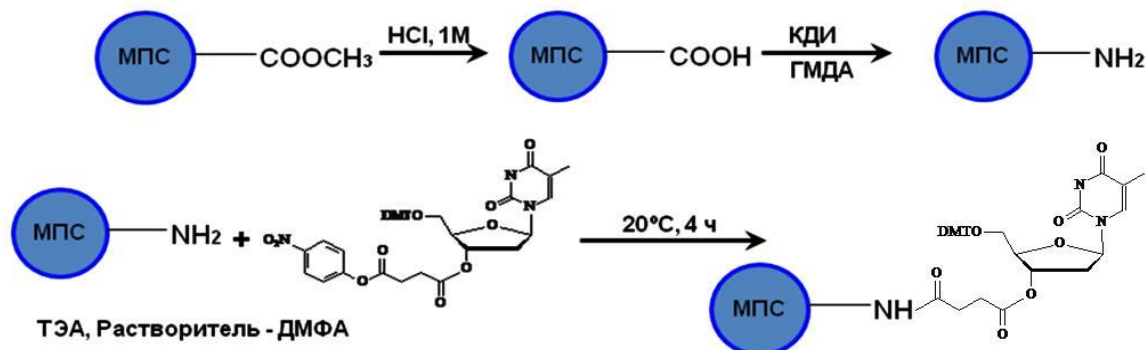


Рисунок 5.48 – Схема последовательной обработки *EVE*-покрытия на поверхности частиц кремнезема Si-500 (ЗАО НИИ Химтех, Армения) с целью иммобилизации нуклеозида DMT-dT-SNPE (Proligo GmbH, Германия). КДИ - *N,N'*-карбонилдиимидазол; ГМДА - гексаметилендиамин; ТЭА - триэаноламин; ДМФА - *N,N*-диметилформамид.

После каждой стадии модифицирования полимерного покрытия отбирали навеску материала (полупродукта) и анализировали методом ИК-спектроскопии (образцы готовили в виде таблеток на основе KBr). В качестве примера на Рисунке 5.49 приведен ИК-спектр исходного *PFOB*-покрытия, на котором четко различим пик, относящийся к $-\text{SO}_2\text{F}$ -группе. Данные, представленные в Таблице 5.16, подтверждают изменения в химической структуре функциональных групп, происходящие в результате последовательного модифицирования полимерной поверхности. В качестве примера в таблице приведены положения и интенсивности пиков, взятых из ИК-спектров образцов *PFOB*-содержащего кремнеземного носителя. Характеристики пиков, соответствующих функциональным группам, образующимся после каждой стадии модифицирования, выделены красным цветом.

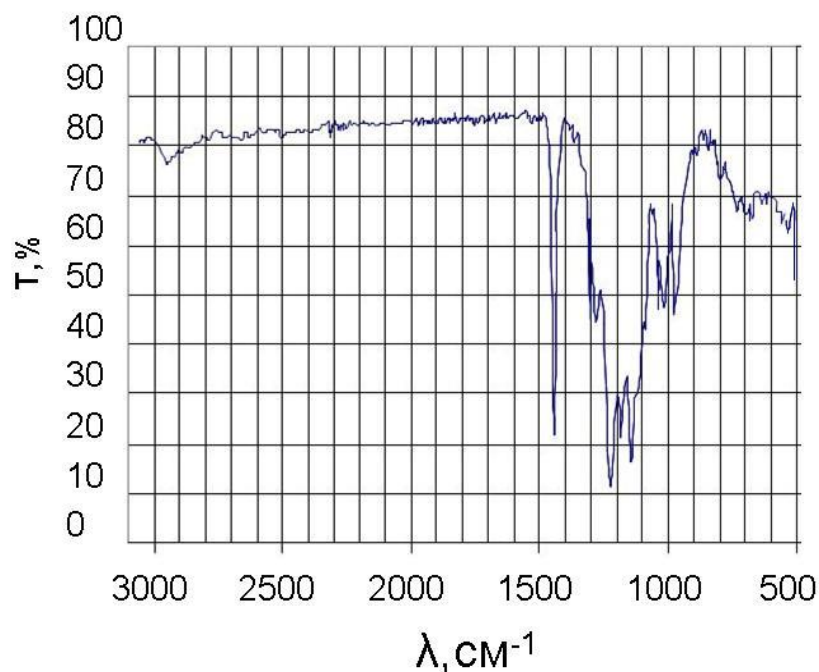


Рисунок 5.49 – ИК-спектр *PFOB*-покрытия до химической обработки.

Таблица 5.16 – Результаты ИК-спектроскопии *PFOB*-содержащего носителя на каждой стадии модифицирования [356].

Стадия модифицирования	Функциональные группы, интенсивность пика, cm^{-1} / T (%)				
	-SO ₂ F	-SO ₂ H	-SO ₂ Cl	-COOH	-NH ₂ , -NH-
исходный носитель	1450 / 63	-	-	-	-
щелочной гидролиз и окисление	1450 / 5	1090 / 51	-	-	-
хлорирование	1450 / 5	1090 / 8	1370 / 35 1420 / 18	-	-
окисление	1450 / 5	1090 / 5	1370 / 2	920 / 10 1780 / 52	-
обработка гексаметилендиамином	1450 / 5	1090 / 5	-	-	1350 / 36 1570 / 28

В результате проведенных манипуляций были получены 4 варианта носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов: кремнеземные материалы, модифицированные слоями *PFOB* или *EVE*, которые наносили с обработкой ультразвуком либо без таковой. Все материалы не смачивались водой. Характеристики полученных носителей, определенные методом ртутной порометрии и в результате тестов на гидролитическую стабильность, представлены в Таблице 5.17.

Таблица 5.17 – Характеристики полимерных покрытий полученных носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов.

Носитель	Si-500	Si-500-PFOB		Si-500-EVE	
Характеристики					
УЗ-обработка	-	нет	есть	нет	есть
Средний эффективный диаметр пор, нм	48	39	38	41	40.5
Удельный объем пор, см ³ /г	1.182	0.679	0.825	0.628	0.896
Удельная площадь поверхности, м ² /г	98.50	84.88	86.84	78.50 – 52.33	88.49
Толщина покрытия, нм	-	1 – 8 (неравно- мерное покрытие)	5	0 – 8 (неравно- мерное покрытие)	3.75
Отношение скоростей растворения кремнезема в 0.01 М NaOH (рН = 12.0) в образцах исходного кремнезема и полученного носителя	-	4.6	12.1	2.4	24.5

Образцы с более равномерным покрытием (полученные с использованием ультразвуковой обработки) были выбраны в качестве носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов. На этих матрицах колоночным методом в автоматическом синтезаторе (по методу, разработанному в компании Proligo GmbH, Германия) синтезировали олигодезоксинуклеотид dT₂₀. Продукт десорбировали с носителя водным аммиаком, сушили и растворяли в деионизованной воде для спектрофотометрического определения выхода. Обессоливание синтезированных олигонуклеотидов проводили ВЭЖХ-методом в обращенно-фазовом режиме.

В Таблице 5.18 для каждого материала указаны поверхностная концентрация иммобилизованного нуклеозида (которую оценивали тритильным методом [419]), а также выход и чистота синтезированного dT₂₀ олигонуклеотида. В качестве материала для сравнения использовали носитель, разработанный компанией ЗАО «НПФ Синтол» (Россия), получаемый в результате обработки кремнезема низкомолекулярными модификаторами.

Таблица 5.18 – Характеристики синтезированных олигонуклеотидов (dT₂₀).

Носитель	Поверхностная концентрация остатка нуклеозида, мкмоль/г	Выход dT ₂₀ , ОЕ/мл	Чистота dT ₂₀ (по данным ВЭЖХ-анализа), %
Si-500- <i>PFOB</i>	8.98	14.3	52.4
Si-500- <i>EVE</i>	9.33	15.0	57.3
носитель производства ЗАО «НПФ Синтол» (Россия)	12.0	5.9	40.4

Можно видеть, что носители, полученные в результате обработки кремнезема фторполимерными модификаторами, превосходят по своим свойствам материал, взятый для сравнения. Поверхностная концентрация иммобилизованного остатка нуклеозида на синтезированных носителях оказалась приблизительно на 25 % меньше, чем на коммерческом носителе, обработанном низкомолекулярным модификатором. В то же время значение оптической плотности раствора синтезированного олигонуклеотида, равное 15 (при использовании носителя Si-500-*EVE*), соответствовало его концентрации, равной ~ 90 пмоль/мкл [420], что примерно в 2.5 раза превышало значение, полученное после использования коммерческого носителя.

Полученные материалы сохраняли свои свойства при хранении (+ 4°C). Так, содержание доступных нуклеозидных остатков в Si-500-*EVE*-материале, определенное через 9 месяцев после синтеза, составило ~ 9.25 мкмоль/г, что практически совпало с величиной, определенной для свежеприготовленного носителя - 9.33 мкмоль/г (разница составила всего 0.86 %).

Таким образом, разработанные композиты находят применение не только в пробоподготовке а области молекулярной диагностики, но также в смежных областях нанобиотехнологии, в частности, в качестве носителей для твердофазного синтеза олигонуклеотидов.

5.4. Применение ФП-модифицированных кремнеземных носителей для определения содержания витаминов в крови

Выше было показано, что разработанные полимерсодержащие композиционные материалы по-разному взаимодействуют с НК и с веществами белковой природы (несмотря на то, что молекулы НК и молекулы белков/пептидов несут определенный заряд и, как правило, хорошо растворимы в воде). Это означает, что ФП- и ПАНИ-модифицированные сорбенты не являются ионообменниками в традиционном понимании, но представляют собой класс материалов, взаимодействующих с биополимерами в результате одновременной реализации различных механизмов сорбции (Глава 3). Поэтому имелись основания предположить, что материалы, модифицированные фторсодержащими полимерами, за счет низкой неспецифической сорбции в определенных условиях будут демонстрировать эффект «*негативной селекции*» не только в отношении НК, то и в отношении других биологически-активных соединений.

В качестве объекта исследования были выбраны витамины, а основной задачей на данном этапе стала разработка способа совместного определения содержания различных витаминов в образце крови. Выбор витаминов в качестве объекта определялся несколькими причинами. Во-первых, поскольку химическая структура молекул витаминов (и их производных), присутствующих в крови, сильно различается, молекулы этих веществ распределяются между двумя несмешивающимися жидкими фазами в соответствии с их химической структурой. Различают две фракции витаминов – жирорастворимую и водорастворимую. Было сделано предположение, что молекулы, входящие в состав указанных фракций, будут по-разному удерживаться фторполимерной поверхностью в зависимости от состава среды, что позволит получать препараты, обогащенные индивидуальными компонентами требуемой фракции в концентрациях, пропорциональных их содержанию в исходном образце цельной крови. Ожидалось, что условия пробоподготовки обеспечат удаление примесей, мешающих последующему ВЭЖХ-анализу индивидуальных витаминов, а концентрирование жирорастворимых фракций и их последующая очистка методом твердофазной экстракции с помощью разработанного сорбента позволят повысить чувствительность анализа.

Во-вторых, разработка эффективных способов определения содержания витаминов в жирорастворимых и водорастворимых витаминах в крови является важной и не до конца решенной задачей, в то время как мониторинг их содержания не только

позволяет судить о наличии патологического процесса, но также помогает выявлять различные заболевания и болезненные состояния на ранней стадии их возникновения. Витамины (наряду с незаменимыми аминокислотами, полиненасыщенными жирными кислотами и др.) являются жизненно важными пищевыми веществами. Они участвуют в разнообразных химических превращениях, оказывают регулирующее влияние на обмен веществ и тем самым обеспечивают нормальное течение практически всех биохимических и физиологических процессов в организме. Дефицит или избыток соответствующих метаболитов (т. н. «витамеров») в биологических жидкостях (прежде всего, в крови), а также изменения в соотношении содержания отдельных витаминов по сравнению с нормальными значениями являются важными диагностическими показателями.

В-третьих, существующие методы определения содержания витамеров в крови, как правило, трудоемки, позволяют анализировать содержание только конкретного витамина (его производного) или витамеров одной группы, и далеко не всегда обеспечивают высокую чувствительность анализа.

Известные способы определения витаминов удобно отнести к трем основным группам. К первой группе относят иммуноферментные методы (в том числе, радиоиммунные, энзимоиммунные, иммунофлуоресцентные и пр.), с помощью которых чаще всего определяют витамин В₁₂, фолиевую кислоту и некоторые другие. Проведение анализа включает такие стадии, как получение конъюгатов (сложная и длительная процедура, занимающая до трех суток), диализная очистка полученных конъюгатов, подготовка носителя (планшета), собственно анализ (отнимающий до 16 ч) и спектрофотометрическое определение продукта. Чувствительность таких методов (до 2.5 нг/мл) обеспечивает количественное определение, однако эти методы трудоемки и не позволяют определять в одном образце большое число различных витаминов [421, 422].

Ко второй группе относят спектрофотометрические методы. Определение содержания определенного витамина (или его производного) проводят, измеряя оптическую плотность раствора продукта реакции витамина со специфическим реагентом при характеристической длине волны. Этими методами определяют большинство водо- и жирорастворимых витаминов. Для реализации спектрофотометрического определения необходимо приготовить специфический реагент, провести реакцию с получением окрашенного продукта, затем провести анализ. Чувствительность таких методов, как правило, составляет мг/мл, поэтому такими способами чаще всего проводят качественное определение. Важно отметить,

что для определения каждой группы витаминов необходимо использовать специальный реагент и обеспечивать соответствующие условия проведения реакции, что приводит к необходимости использовать разные тест-системы для определения каждого конкретного витамина [423].

К третьей группе относят хроматографические методы определения (ВЭЖХ-анализ, твердофазная экстракция), с помощью которых можно определять содержание большинства водо- и жирорастворимых витаминов в пробах крови. При использовании этих методов для анализа водо- и жирорастворимых витаминов, как правило, проводят раздельную пробоподготовку. Кроме того, часто необходимо объединять несколько образцов для повышения чувствительности анализа. Следует отметить, что условия хроматографического анализа, как правило, различаются не только при определении отдельных фракций витаминов, но также при определении витаминов из одной фракции, но относящихся к отдельным классам соединений. Чувствительность метода зависит от параметров детектора, однако при использовании современных хроматографов, колонок и детекторов в большинстве случаев обеспечивается количественное определение. К третьей группе методов также можно отнести процедуры определения содержания витаминов с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), в частности, определение водорастворимых витаминов в поливитаминных препаратах. К недостаткам этих методов следует отнести низкую чувствительность, что делает их применение неэффективным при анализе содержания витаминов в крови, поскольку витамины в крови присутствуют в значительно более низких количествах, чем в поливитаминных препаратах [424, 425]. Одним из примеров современного подхода к определению витаминов в крови служит схема, разработанная компанией “RECIPE Chemicals + Instruments GmbH”, Германия). Наборы, предлагаемые этой компанией, обеспечивают определение следующих витаминов: А и Е в плазме; В1 в цельной крови; В2 в цельной крови; В6 в плазме/цельной крови; D2 и D3 в сыворотке/цельной крови [426]. Однако в результате использования *«растворной химии»* (т. е. при отсутствии стадии твердофазной экстракции) эти наборы обеспечивают выделение только индивидуальных компонентов (витаминов) из биологической смеси, что, очевидно, требует индивидуальной пробоподготовки для обнаружения каждого конкретного компонента.

В настоящем исследовании при разработке способа совместного определения содержания жирорастворимых и водорастворимых витаминов в крови использовали растворы стандартов витаминов и образцы сыворотки человеческой крови. В первую очередь

следовало убедиться в том, что фторполимерсодержащие сорбенты эффективно удерживают остаточные компоненты белково-пептидной фракции, присутствующие в составе сыворотки, которую получали из препаратов цельной крови (стабилизированной ЭДТА-К₂) путем добавления к крови двойного объема ацетонитрила с целью осаждения белковых/пептидных компонентов. На Рисунке 5.50 представлены хроматограммы образца сыворотки, полученной после осаждения белковых компонентов ацетонитрилом с последующим концентрированием (а) и элюата, полученного после пропускания того же образца сконцентрированной сыворотки через картридж с ФП-сорбентом (б).

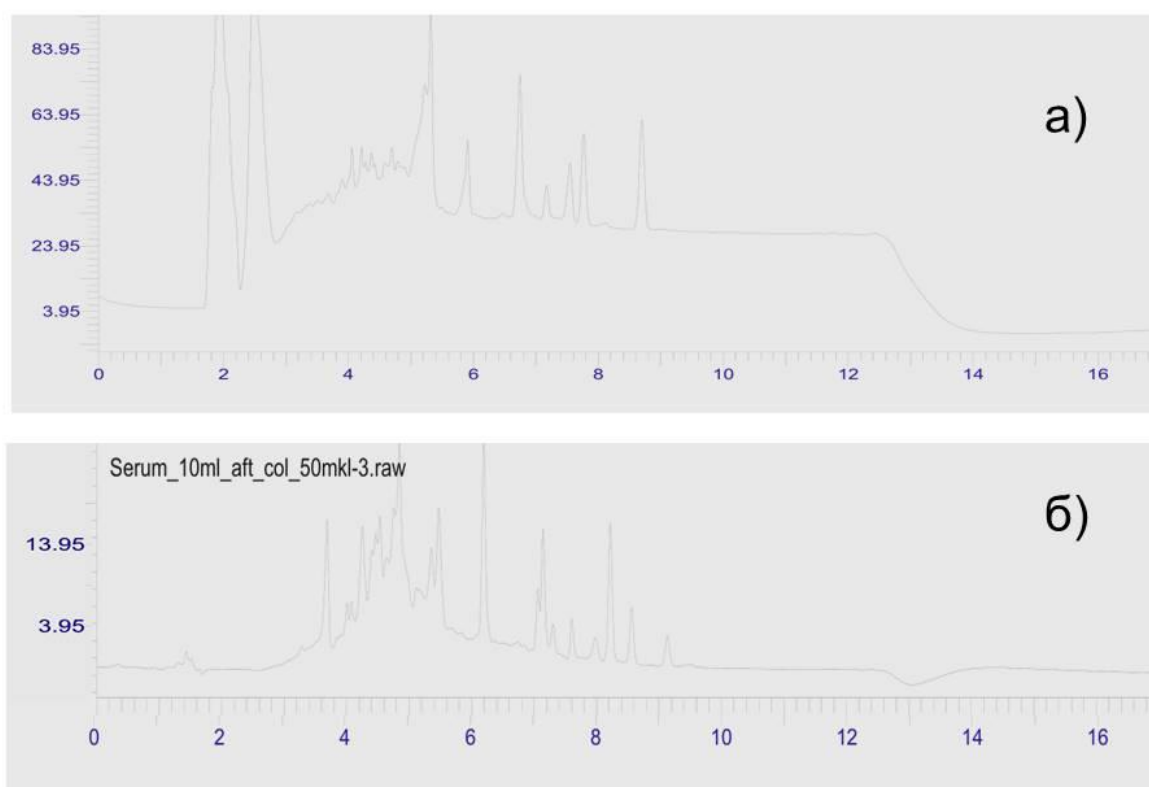


Рисунок 5.50 – Хроматограммы образцов сыворотки крови: а) – сыворотка, полученная после осаждения белковых компонентов двукратным объемом ацетонитрила с последующим концентрированием; б) - элюат, полученный после пропускания того же образца сконцентрированной сыворотки через картридж с ФП-сорбентом.

Из сравнения приведенных на Рисунке 5.50 хроматограмм становится очевидным, что ФП-сорбентом удерживается не менее 70 % компонентов сыворотки, в частности, гидрофильные (преимущественно низкомолекулярные) и гидрофобные (преимущественно высокомолекулярные) фракции, что было подтверждено сравнением суммарных площадей пиков на обеих хроматограммах. Оставалось

выяснить, присутствуют ли витаминеры в не удерживаемой сорбентом фракции в концентрациях, достаточных для достоверного анализа их содержания.

Применяли следующую схему обработки образцов. К полученной сыворотке добавляли *n*-гексан для проведения жидкофазной экстракции. Полученные водо- и жирорастворимые фракции отбирали и наносили на картриджи с ФП-сорбентом для осуществления твердофазной экстракции. Полученные элюаты анализировали с помощью ВЭЖХ.

На первом этапе исследования определяли условия, при которых стандарты конкретных витаминов не удерживаются поверхностью ФП-сорбента, а также подбирали условия, при которых компоненты жиро- и водорастворимых фракций удается эффективно разделить в обращено-фазовом режиме ВЭЖХ.

На втором этапе аликвоты стандартных растворов витаминов добавляли к образцам сыворотки крови и проводили аналогичные тесты. Затем проводили анализ спектров поглощения витаминов и их производных в различных средах, пригодных для эффективной экстракции жиро- и водорастворимой фракций и последующего хроматографического разделения компонентов выделенных фракций. Определяли число, положение и интенсивности характеристических пиков на хроматограммах. Сопоставляли пики и их положения в спектре для групп производных конкретных витаминов в сыворотке крови. Определяли характеристические пики, пригодные для количественного анализа конкретных витаминов (производных), сравнивая их со спектрами растворов стандартных препаратов витаминов. После этого оптимизировали состав подвижной фазы и условия разделения для обеспечения воспроизводимости и удовлетворительной чувствительности анализа витаминов. Проводили статистическую обработку данных хроматографического анализа содержания жиро- и водорастворимых витаминов в клинических образцах с помощью разработанного метода пробоподготовки и анализа и оценивали соответствие полученных результатов клиническим наблюдениям. Оценку проводили на основе анализа результатов соотношения времен удерживания ($T_{уд}$) при хроматографическом разделении компонентов витаминсодержащих смесей и максимумов поглощения в УФ- и видимой области индивидуальных хроматографических пиков.

Анализ полученных данных позволил сделать следующее заключение. Несмотря на то, что изменение состава среды приводило к ожидаемому сдвигу максимумов поглощения, либо к появлению новых максимумов в индивидуальном спектре анализируемого компонента (как, например, в случае витамина B12), во всех случаях наблюдали как минимум два или более совпадающих характеристических

максимума. Присутствие таких максимумов в спектре (с одновременным учетом времени удерживания конкретного компонента на хроматограмме) дает возможность идентифицировать анализируемый компонент.

В качестве примера на Рисунке 5.51 представлена совокупность характеристических пиков поглощения в УФ- и видимом диапазонах для препарата витамина В12 в различных средах.

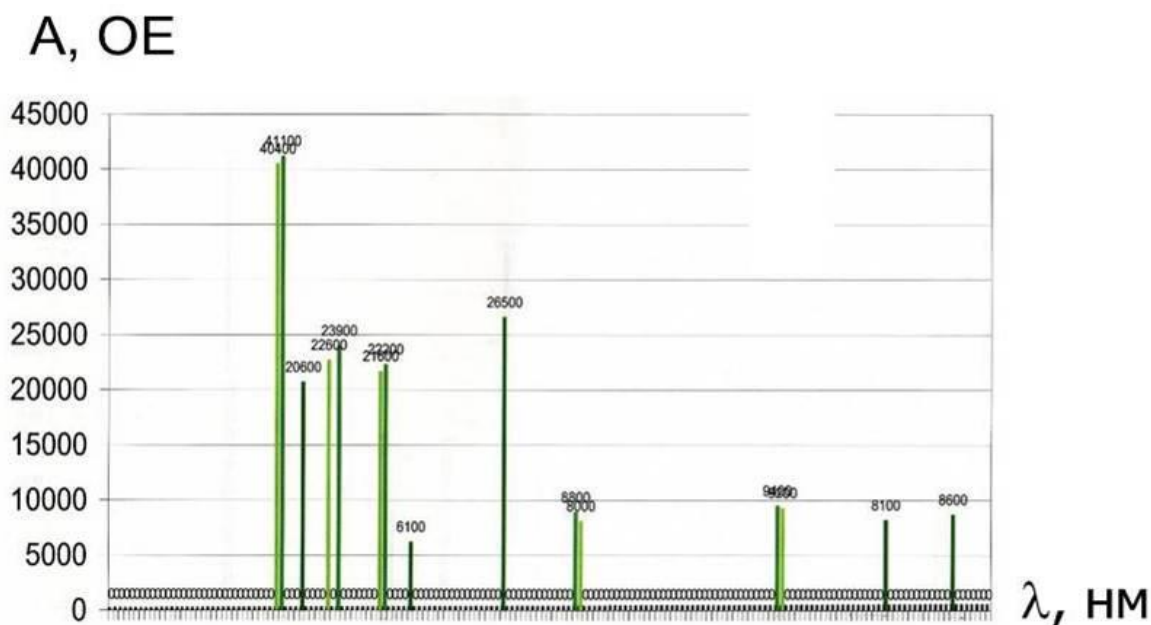


Рисунок 5.51 – Пики поглощения в УФ- и видимом диапазонах поглощения препарата витамина В12 в воде (зеленые бары), в 5 % водном ацетонитриле (бары салатового цвета) и в 40 % водном ацетонитриле (темно-зеленые бары).

Для наглядности пики представлены в виде баров, высота которых соответствует интенсивности пиков. Видно, что положение большинства характеристических пиков не изменяется при изменении состава растворителя.

В Таблице 5.19 сведены данные, полученные в результате экспериментального определения времен удерживания при хроматографическом разделении компонентов смесей стандартов витаминов и максимумов поглощения в УФ- и видимой области, соответствующих индивидуальным хроматографическим пикам, получаемым при нанесении на хроматографическую колонку образцов сыворотки крови с добавленными стандартами.

Таблица 5.19 - Результаты соотнесения времен удерживания ($T_{уд}$) при хроматографическом разделении компонентов витаминсодержащих смесей и максимумов поглощения в УФ- и видимой области фракций, соответствующих индивидуальным хроматографическим пикам.

Витамин	$T_{уд}$ мин, стандарт	$T_{уд}$ мин, реальное	№ пика	Производное	Пик поглощения, нм	
					стандарт	реальный
1	2	3	4	5	6	7
Водорастворимые витамины						
B₁	10.25-10.6 10.4	10.25	20	Тиаминпирофосфат (дифосфотиамин; кокарбоксилаза; ТРР; тиаминдифосфат)	202	202
				Тиаминхлоридгидрохлорид (тиамингидрохлорид; гидрохлорид витамина B ₁ ; гидрохлорид аневрина)	248 270	230 275
B₅	10.9-11.01 11.20	10.24	21	Пантотеновая кислота (амид 2,4-дигидрокси3,3-диметилмасляная кислоты и β-аланина)	197	197
		11.21 11.91	22		322	324
B₆	9.66	9.51	17	Пиридоксаминдигидрохлорид	205	205
		9.69	18	Пиридоксаминфосфат (пиридоксамин-5'-фосфат)	230	235
		9.83	19		290 610	
B₁₂	18.14	18.14	29	Кофермент B12 (5'-дезоксаденозилкобаламин; α-(5,6-диметилбензимидазолил)кобамидный кофермент; α-(5,6-диметилбензимидазол)-5'-дезоксаденозилкобамид)	205	205
		18.34	30		225 275 280 305 315 370 525	225 275 280 305
				Метилкобаламин (метил-B12; α-(5,6-диметилбензимидазолил) метилкобамид		
				<i>Аквокобаламин, кислый раствор (витамин B_{12a})</i>		
				<i>[Цианкобаламин (витамин B₁₂ (α-(5,6-диметилбензимидазолил)-цианокобамид);</i>		
				<i>Гидроксикобаламин, (α-(5,6-диметилбензимидазолил)-гидроксикобамид; витамин B_{12b})]</i>		

1	2	3	4	5	6	7
С	1.6-1.85	1.97	7	Аскорбиновая кислота (L-аскорбиновая кислота)	190	200
	1.68	2.38	8		245	250
				Дегидро-L-аскорбиновая кислота (окисленная форма витамина С)	265	265
						200
						245
						270
Жирорастворимые витамины						
А	4.82	5.02	1	Ретинол, полный <i>транс</i> -изомер (витамин А ₁ ; аксерофтол)	205	205
	6.95	7.04	13		250	255
					325	325
					354	
Д	9.38	9.19	14	Эргокальциферол (витамин D ₂ ; кальциферол; эркальциол)	205	205
					220	265
				1 α, 25-Дигидроксихолекальциферол (9,10-секохолестатриен-5,7,10(19)-триол-1 α, 3 β, 25; 1 α, 25-дигидроксивитамин D ₃ ; кальцитриол)	280	
				[Эргостерол (эргостерин; провитамин D ₂)]		
Е	9.83	9.89	15	Токоферол (витамин Е; α-токоферол; β-токоферол: 5,7,8-триметилтокол; γ-токоферол: 7,8-диметилтокол; δ-токоферол: 8-метилтокол)	215	210
	10.45				230	290
К	11.0-11.5	10.78	17	Убихинон (убихинон-п; Q-n; кофермент Q _n ; CoQ _n ; убихинон-5n; Q ₁₀ ; CoQ ₁₀ ; убихинон-50)	215	210
	11.30	12.12	18		245	245
				Пластохинон (пластохинон-n; PQ-n; пластохинон-5n; пластохинон А)	265	270
				Менахинон (n = 6: менахинон-6; МК-6; витамин К ₂ (30); n = 7: менахинон-7; МК-7; витамин К ₂ (35))	330	
					645 сл.	

На Рисунке 5.52 продемонстрирован принцип, положенный в основу калибровки метода ВЭЖХ-определения витаминов по временам удерживания определяемых в сыворотке компонентов, на примере определения в сыворотке добавленных стандартов жирорастворимых форм витамина Е (β-, γ- и δ-токоферолов). Из этого рисунка следует, что время удерживания вещества-стандарта, вводимого в образец сыворотки крови, полностью совпадает со временем удерживания определенного компонента в составе сыворотки. Площадь хроматографического пика индивидуального компонента является функцией его концентрации в пробе, что позволяет получать надежные линейные градуировочные зависимости в интервале

трех - четырех порядков. Гарантируемая величина пределов обнаружения, достигаемых на современных хроматографах, составляет доли мкг/л.

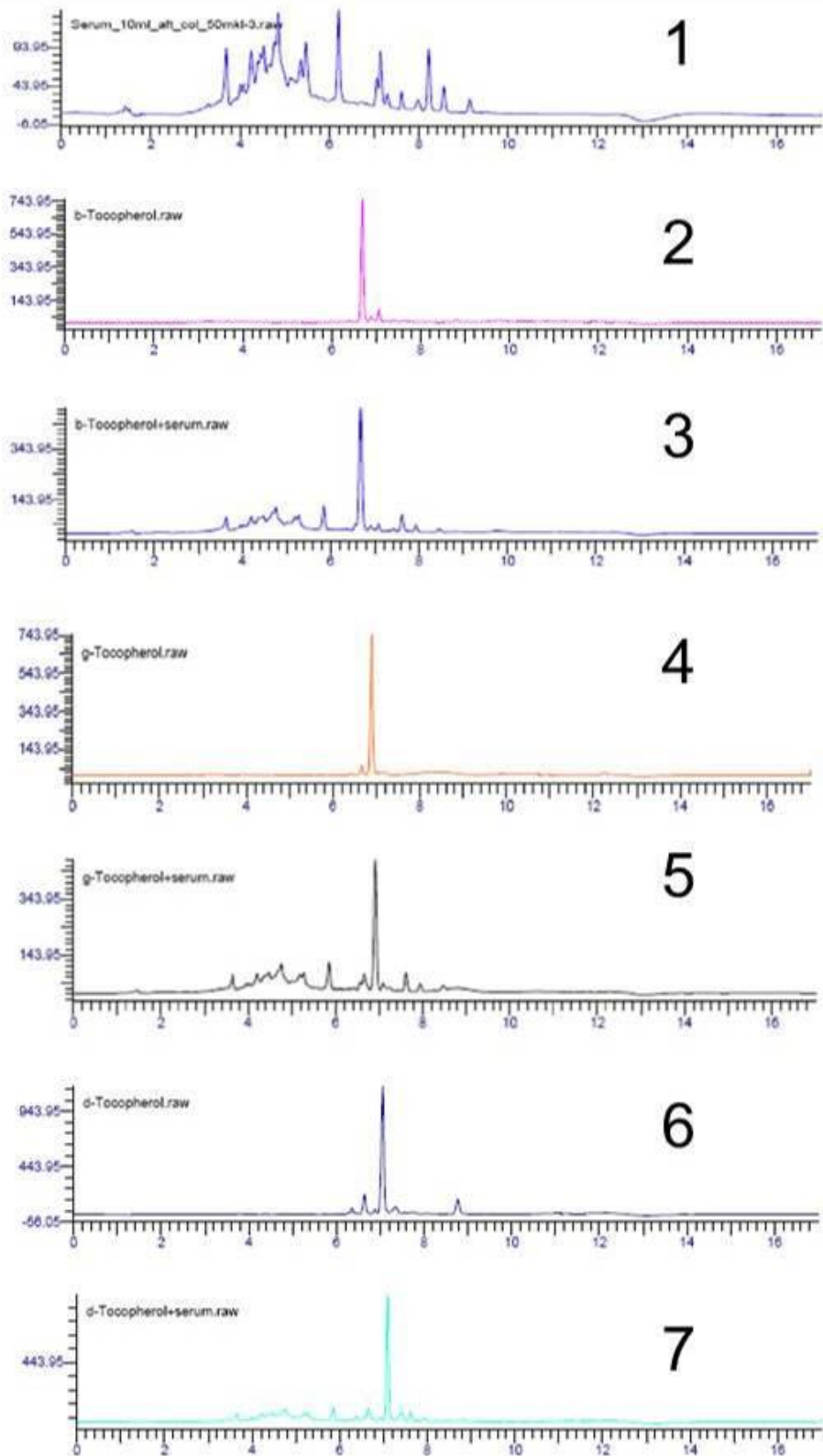


Рисунок 5.52 – Сопоставление времен удерживания стандартов форм витамина Е (β -, γ - и δ -токоферолов – 2, 4, 6, соответственно) и соответствующих им компонентов (3, 5, 7), определяемых в сыворотке крови (1).

Очевидно, что совпадения по единственному параметру (совпадение времен удерживания компонента образца и индивидуального стандарта) недостаточно для установления однозначного соответствия пиков на хроматограммах реального образца и модельного стандарта. Поэтому при проведении анализа должно выполняться еще одно важное условие - соответствие пиков на хроматограмме анализируемого образца и спектров поглощения индивидуального компонента (конкретного витамина). Этот дополнительный принцип легко проиллюстрировать на примере определения витамина В₁₂ (Рисунок 5.53).

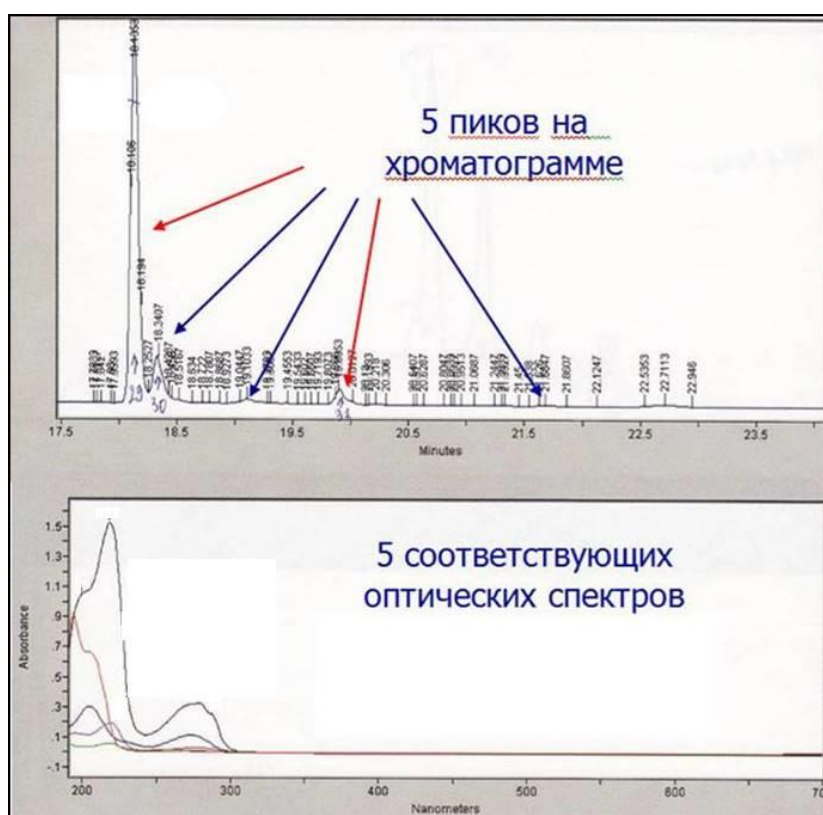


Рисунок 5.53 - Принцип соответствия спектров поглощения индивидуальных пиков на хроматограмме анализируемого образца (элюата, полученного после пропускания водорастворимой фракции через картридж с ФП-сорбентом) спектрам стандарта конкретного витамина (при ВЭЖХ-определении витамина В₁₂).

Из представленного на Рисунке 5.53 лабораторного бланка видно, что как минимум для двух пиков на хроматограмме (указаны красными стрелками) форма оптических спектров достаточно сложна, что позволяет провести однозначное соответствие со структурой спектра витамина-стандарта. Задача усложняется при одновременном анализе содержания нескольких витаминов в определенной фракции реального образца, что проиллюстрировано на Рисунке 5.54. Тем не менее,

современные хроматографические системы обеспечивают возможность проведения одновременного анализа образцов по указанным параметрам в автоматическом режиме.

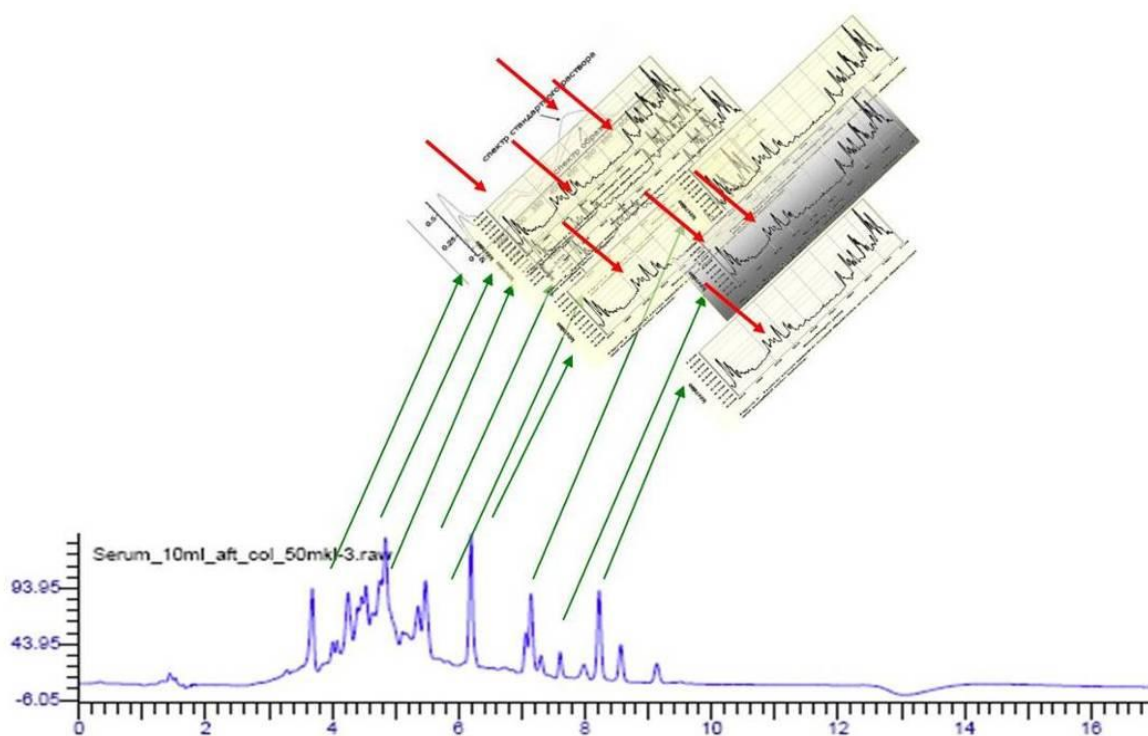


Рисунок 5.54 - Иллюстрация принципа соответствия пика на хроматограмме анализируемого образца одному – трем максимумам поглощения в спектре индивидуального компонента на примере анализа содержания компонентов жирорастворимой фракции витаминов в крови.

Следует отметить, что оптимальный протокол пробоподготовки с целью повышения чувствительности анализа включал помимо стадий жидкофазной и твердофазной экстракции два этапа вакуумного концентрирования. Вначале за счет удаления растворителя в центрифужном испарителе более чем 30 раз уменьшали объем полученной сыворотки (с 20 мл до ~ 0.6 мл). К полученному препарату добавляли двукратный объем *n*-гексана, а затем полученные после жидкофазной экстракции фракции концентрировали перед нанесением их на картриджи с сорбентом. Гексановую фракцию упаривали полностью, а осадок растворяли в метаноле перед нанесением на картридж с сорбентом. Элюцию очищенной фракции жирорастворимых витаминов проводили метанолом. Водную фракцию наносили на картридж с сорбентом непосредственно, элюцию очищенной фракции проводили 30 % ацетонитрилом. Полученные элюаты анализировали методом ВЭЖХ в обращено-фазовом варианте (в градиенте ацетонитрила для выявления водорастворимых витаминов и в градиенте метанола для обнаружения жирорастворимых витаминов).

Разработанный метод пробоподготовки с использованием ФП-содержащего сорбента позволил впервые проводить совместное количественное определение пяти водорастворимых (В₁, В₅, В₆, В₁₂, С) и четырех жирорастворимых (А, D₃, Е, К) производных витаминов в одной пробе крови с помощью одного синтетического сорбента, проявляющего как олеофобные, так и гидрофобные свойства в зависимости от состава используемого элюента. Структуры определяемых витаминов представлены на Рисунках 5.55 и 5.56. Продолжительность ВЭЖХ-анализа (условия подробно описаны в Главе 2 диссертации) составляет не более 17 мин. Требуемая чувствительность анализа обеспечивается достаточным объемом пробы. Для анализа отбирали 10 мл крови, притом, что для определения большинства компонентов (кроме витаминов группы К) достаточно 5 – 6 мл. При использовании плазмы объем пробы может быть уменьшен до 2 – 4 мл. Еще одно преимущество, обеспечиваемое применением картриджей с ФП-сорбентом в пробоподготовке образцов для ВЭЖХ-анализа, заключается в дополнительной очистке пробы, наносимой на хроматографическую колонку (стоимость которой может достигать 300 €). В результате срок службы последней продлевается.

По полученным результатам компанией АНО «Центр Биотической Медицины» (Россия) утверждены методические рекомендации «Определение витаминов в цельной крови человека методом твердофазной экстракции с высокоэффективной жидкостной хроматографией (ТФЭ-ВЭЖХ)». Валидность разработанного метода пробоподготовки витаминсодержащих образцов крови с использованием ФП-сорбента подтверждена сопоставлением результатов анализа крови более 3500 пациентов с данными их клинического обследования и симптоматикой, выявленной при первичной диагностике, в процессе лечения и в результате проведенной терапии патологических состояний, вызванных недостатком или избытком определенных витаминов.

Разработанный метод с успехом применяли в исследованиях витаминного профиля сыворотки крови у различных категорий населения, например, у спортсменов [427].

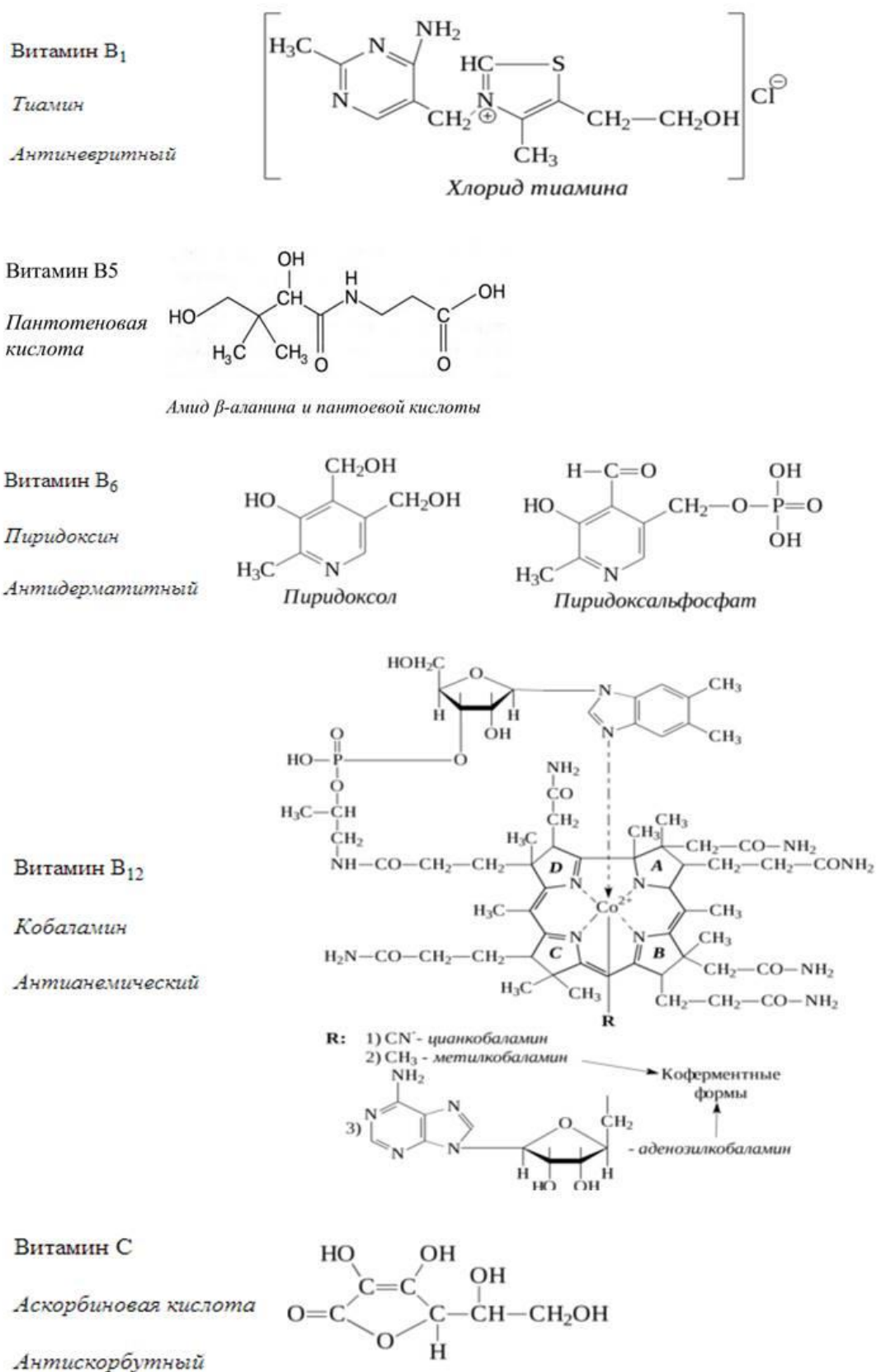


Рисунок 5.55 – Водорастворимые витамины, определяемые в крови разработанным методом с помощью картриджей с ФП-содержащим сорбентом [428].

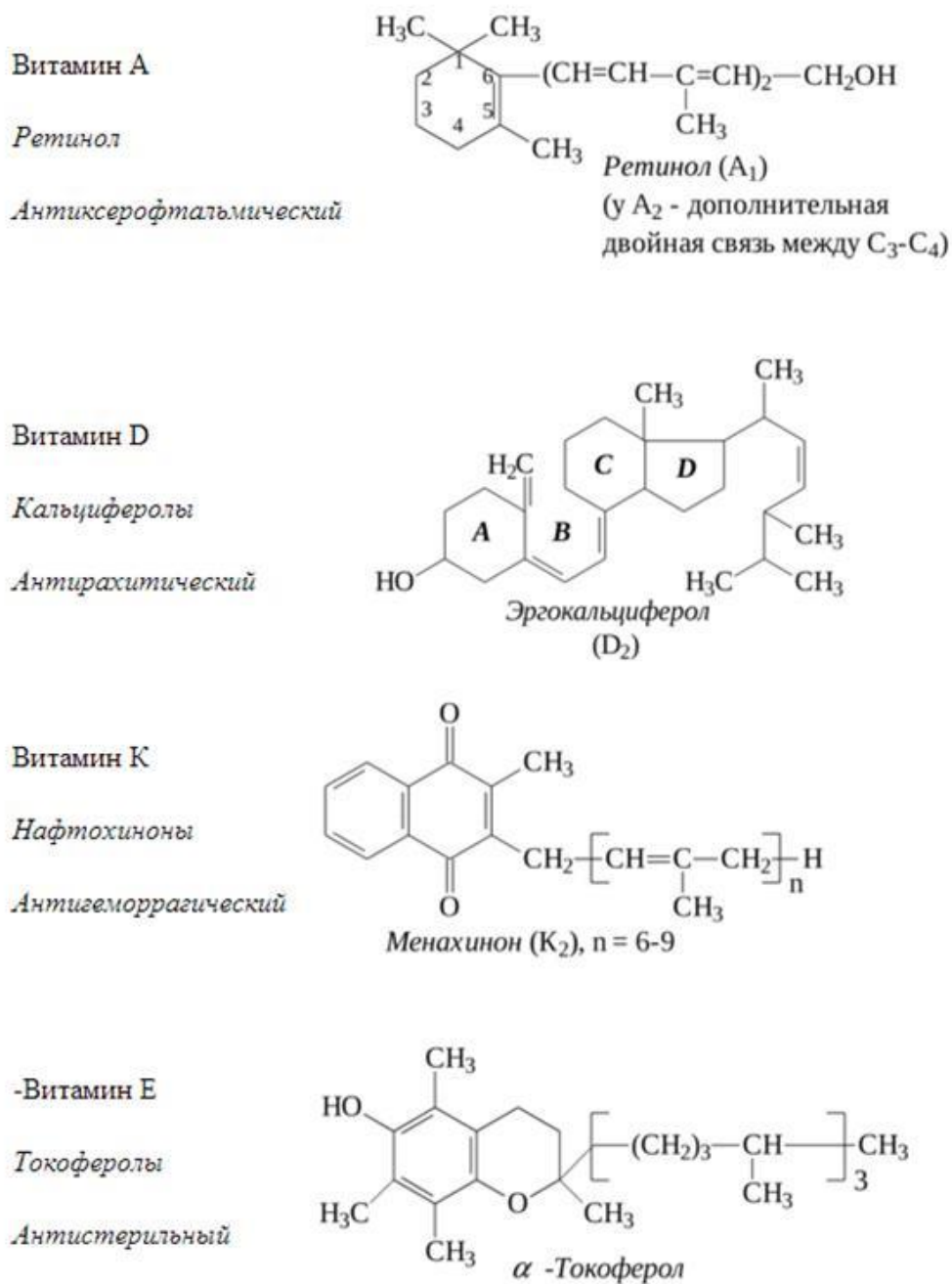


Рисунок 5.56 – Жирорастворимые витамины, определяемые в крови разработанным методом с помощью картриджей с ФП-содержащим сорбентом [428].

Таким образом, разработанные в рамках проведенного исследования технологии позволяют получать полимерсодержащие сорбенты многоцелевого назначения, пригодные для селективного разделения как полимерных, так и низкомолекулярных компонентов биологических смесей.

5.5. Применение разработанных ПАНИ-модифицированных композитов в масс-спектрометрии

В предыдущих подразделах диссертации было показано, что разработанные сорбенты, полученные на основе твердых носителей (таких как объемно-пористые кремнеземы, мембраны, капилляры), модифицированных нанотолщинными слоями фторполимеров и ПАНИ, являются полезным инструментом при выделении/очистке биополимеров (НК и белков), а также низкомолекулярных биологически активных соединений (витаминов). Перечисленные композиты получали, формируя полимерные нанотолщинные покрытия на поверхности твердых пористых подложек. В Главе 3 диссертации при обсуждении результатов исследования сорбционных свойств полиарамидных, ФП- и ПАНИ-покрытий с применением метода СКИ было показано, что не менее эффективными «рабочими телами» при осуществлении обратимой сорбции биополимеров могут служить плоские непористые стеклянные пластины с нанесенными покрытиями исследуемых полимеров. Поэтому имелись основания полагать, что область практического применения таких носителей может быть расширена.

Выше было показано, что введение дополнительной функциональности в макромолекулы фторполимеров позволяет расширить область их применения. В результате проведенных исследований оказалось, что введение дополнительных функциональных групп в ПАНИ-покрытия также открывает новые возможности для их использования в биоанализе.

Убедительным примером эффективного применения покрытий на основе сополимеров анилина с 3-аминобензойной кислотой (ПАНИ-3-АБК) в биоаналитических целях служит использование кремниевых пластин (чипов), покрытых слоем ПАНИ-3-АБК, в качестве рабочих поверхностей при проведении масс-спектрометрического (МС) анализа пептидов.

Термином «масс-спектрометрия» (МС – русск. или MS – англ.) обозначается группа инструментальных методов анализа, широко применяемых для определения молекулярной массы и исследования структуры различных соединений. Эти методы основаны на ионизации молекул образца и переводе молекулярных ионов в газовую фазу. Молекулярные ионы разделяются в электрическом или магнитном полях в высоком вакууме в зависимости от величины отношения их массы к заряду (m/z). В последние несколько десятилетий МС зарекомендовал себя как незаменимый метод для точного и чувствительного анализа биополимеров, в частности, белков и

пептидов. Благодаря появлению методов мягкой ионизации, таких как «электрораспылительная ионизация» (ESI) и «активированная матрицей лазерная десорбция/ионизация» (MALDI), стало возможным переводить в газовую фазу и ионизировать нелетучие, крупные и термолабильные молекулы без их существенного разрушения [429, 430].

В варианте MALDI молекулы образца кристаллизуют вместе с так называемым «веществом-матрицей» - поглощающим излучение лазера ароматическим соединением, которое добавляют к образцу в большом избытке. Импульсный УФ-лазер обеспечивает энергию для ионизации и десорбции анализируемого вещества, например, белка. «Матрица» поглощает энергию фотона и передает ее образцу. При исследовании веществ в формате MALDI в установку для МС в большинстве случаев помимо ионизатора включают анализатор времени полета (“time of flight” - TOF). Разделение ионов достигается за счет их ускорения в трубке в отсутствие поля. Измеряемое время полета пропорционально величине m/z . При проведении MALDI-TOF-MS молекулы с массами более 10^5 Да могут быть ионизированы без заметной фрагментации.

Перед MALDI-MS-анализом сложные образцы (такие как клеточные лизаты, сыворотка крови) следует предварительно фракционировать для удаления солей и поверхностно-активных веществ с целью упрощения состава образца. Обычно для этого применяют жидкостную хроматографию, электрофорез и изоэлектрическое фокусирование. В начале 1990-х годов метод MALDI был усовершенствован вначале за счет комбинирования с «хроматографическим предфракционированием образца на аффинной поверхности» (SEAC), позднее стали использовать варианты «ионизации за счет лазерной десорбции, усиленной поверхностью» (SELDI) и ковалентного связывания матрицы с пластиной для удерживания образца в варианте, называемом «усиленная поверхностью беспримесная десорбция» (SEND).

В варианте SELDI образец предварительно фракционируют на хроматографической поверхности, которая связывает определенную подгруппу молекул образца. Каждый образец наносится в виде точки (объемом ~ до 4 мкл) на поверхность кремниевой пластины (чипа). Чипы размещаются в специальном держателе, так называемом биопроцессоре, выполненном в виде планшета для микротитрования, который обеспечивает одновременную быструю обработку большого количества образцов. Несвязанные молекулы удаляются промывкой буферным раствором. Как и в MALDI, перед проведением анализа к образцу добавляют поглощающую лазерное излучение «матрицу». Нередко в качестве

«матриц» используют ароматические кислоты (например, α -циано-4-гидроксикоричную кислоту). Ионизация образца происходит непосредственно с поверхности чипа. Добавление «матрицы» – один из наиболее чувствительных шагов в процедуре пробоподготовки. Раствор «вещества-матрицы» очень летуч и, как правило, добавляется в очень небольших объемах (0.5 - 2 мкл). В этом растворе растворяются молекулы биологического образца, и затем материал матрицы кристаллизуется совместно с биомолекулами. Сильное влияние на результаты пипетирования и сокристаллизации оказывают температура и влажность окружающего воздуха. Кроме того, анализ биополимеров с низкой молекулярной массой с использованием MALDI или SELDI осложняется тем фактом, что сама «матрица» также ионизируется и десорбируется. Это приводит к появлению сильных фоновых сигналов в низкомолекулярной части масс-спектра (приблизительно ниже 1000 - 1500 Да), что делает крайне трудным или даже невозможным обнаружение сигналов образца в указанном диапазоне масс.

Описанные подходы пригодны для диагностики, например, ранних стадий рака или иммунного ответа организма на инфекции [431]. Тем не менее, использование MALDI- и SELDI-MS в рутинных экспериментах ограничено, в основном из-за низкой воспроизводимости (высок коэффициент вариации), обусловленной в первую очередь свойствами хроматографической поверхности и чувствительностью этапа введения «вещества-матрицы».

Таким образом, не вызывает сомнений актуальность разработки материала, при использовании которого при проведении MS-анализа фоновый сигнал уменьшался бы настолько, чтобы не мешать интерпретации спектра аналита, а добавления «вещества-матрицы» не требуется.

Идея о создании такого материала была основана на замене «вещества-матрицы» поверхностью полимерного материала, равномерно распределенного по поверхности кремниевого чипа. Оказалось, что поставленная задача может быть решена в результате применения полимерного покрытия, имеющего в составе полисопряженные ароматические звенья, способные поглощать лазерное излучение, например, покрытия на основе ПАНИ или его производных. Предполагалось, что поверхность полимерного покрытия будет поглощать энергию лазера, передавая ее молекулам образца, предварительно нанесенным на эту же полимерную поверхность. В процессе облучения лазером полимерная поверхность может нагреваться и разрушаться. Поэтому использование анилинсодержащих полимерных покрытий, демонстрирующих исключительно высокую стойкость к окислению и термическому

воздействию, представлялось целесообразным. Дополнительным преимуществом является тот факт, что анилинсодержащие полимерные покрытия служат селективной хроматографической подложкой, пригодной для разделения компонентов нанесенной на ее поверхность анализируемой пробы (такой, например, как смесь пептидов и/или белков). В качестве полимерного материала, применение которого позволило бы решить поставленную задачу, было решено использовать сополимеры анилина с 3-АБК, поскольку введение 3-АБК-звеньев в полимерную цепь позволяет получать растворимые анилинсодержащие полимеры.

В исследовании использовали неокисленные и окисленные кремниевые пластины (70 x 8 x 0.5 мм), применяемые для нанесения аналита при проведении SELDI-MS. Окисление поверхности пластин проводили, нагревая их до 1000°C и затем выдерживая в токе воздуха или кислорода в течение 4 ч. Поверхность части неокисленных предварительно прокипяченных в воде (16 ч) пластин силаминировали, обрабатывая 5 % водным раствором γ -АПТЭС в течение 0.5 ч.

Сополимеры анилина с 3-АБК получали по методике, описанной в Главе 2 диссертации. Проводили элементный анализ состава полученных сополимеров, результаты которого представлены в Таблице 5.20. Полученные данные подтвердили, что в результате синтеза мономерные звенья 3-АБК вводятся в состав макромолекулы сополимера 3-АБК-ПАНИ. Этот факт также был подтвержден тестами на растворимость полученных материалов. В отличие от гомополимера ПАНИ, сополимеры анилина с 3-АБК в случае, когда анилин и 3-АБК были взяты в соотношении 1:1, растворялись в ТГФ и в водной среде при $\text{pH} \geq 9.0$, в то время как сополимер 3-АБК-ПАНИ, полученный при соотношении мономеров, равном 3:1, не растворялся ни в водных средах, ни в органических растворителях.

Синтезированные (со)полимеры суспендировали (ПАНИ и 3-АБК-ПАНИ, 3:1) или растворяли (ПАБК и 3-АБК-ПАНИ, 1:1) в ТГФ, наносили раствор (суспензию) на поверхность пластин КВг и выпаривали растворитель с целью получения образцов для проведения ИК-спектроскопии. Максимум поглощения при $\lambda = 1700 \text{ см}^{-1}$ (карбоксыльная группа) возрастал пропорционально содержанию звеньев 3-АБК в цепях синтезированных (со)полимеров.

Таблица 5.20 – Сравнение теоретического и определенного элементным анализом содержания элементов в полученных гомо- и сополимерах анилина с 3-АБК.

Полимер	Теоретические величины				Результаты элементного анализа			
	С	Н	N	О	С	Н	N	О
ПАНИ	79	6	15	0	81	5	14	0
3-АБК-ПАНИ (3:1)	74	4	14	8	59	4	11	26
3-АБК-ПАНИ (1:1)	69	5	12	14	60	3	10	28
ПАБК	63	3	10	24	58	3	8	31

При разработке метода нанесения устойчивого полимерного покрытия на поверхность кремниевой пластины, во-первых, требовались растворимые анилинсодержащие сополимеры, во-вторых, следовало оценить, необходима ли предварительная химическая обработка кремниевой поверхности для обеспечения удерживания полимерного покрытия.

Для модифицирования поверхности кремниевых пластин ПАНИ-покрытием на поверхности пластин проводили окислительную осадительную полимеризацию анилина в тех же условиях, что и при модифицировании неактивированного кремнезема (Глава 4). Покрытие поверхности пластин ПАБК проводили, дважды обрабатывая пластины 5 % раствором гомополимера в ТГФ с последующей сушкой горячим воздухом.

Покрытие поверхности кремниевых пластин полученными сополимерами проводили в разных условиях: в результате нанесения на поверхность пластины 5 % раствора (или суспензии - 25 мг/мл) в ТГФ либо в результате хемосорбции на предварительно силанированную кремниевую поверхность. При необходимости после испарения растворителя процедуру повторяли, получая двойной или тройной полимерный слой. Хемосорбцию ПАБК на поверхности силанированных пластин проводили карбодиимидным методом (Глава 2). Полученные полимерные покрытия оказались устойчивыми при инкубировании в водных средах в диапазоне рН 2 - 9 в течение более 1 ч (что вполне достаточно для проведения МС-анализа).

С целью демонстрации эффекта разделения смесей белков на полимермодифицированных пластинах была предложена схема эксперимента, в соответствии с которой белки предварительно метили так называемыми «квантовыми точками» - люминисцентными полупроводниковыми нанокристаллами CdSe/ZnS (с максимумами флуоресценции при 546, 581 и 610 нм) [432]. В результате был разработан несложный наглядный способ визуализации удерживания модельных

меченых белков 3-АБК-ПАНИ-поверхностью в зависимости от значения рI белка и рН элюента. Растворы индивидуальных меченых белков (с концентрацией 0.5 мг/мл), а также их смесь точно (по 5 мкл) наносили на модифицированную 3-АБК-ПАНИ поверхность кремниевой пластины и выдерживали 5 мин при комнатной температуре. Затем пластину последовательно промывали буферными растворами с различными значениями рН. После каждой промывки сорбцию белков визуализировали в УФ-свете. Полученные результаты представлены на Рисунке 5.57 и в Таблице 5.21. Было подтверждено (см. Главу 3), что разделение компонентов смесей белков в зависимости от заряда их молекул (значения изоэлектрической точки - рI) можно осуществлять непосредственно на кремниевых пластинах, модифицированных анилинсодержащим сополимером, используя в качестве элюента трис-НСI буфер или другой подходящий раствор.

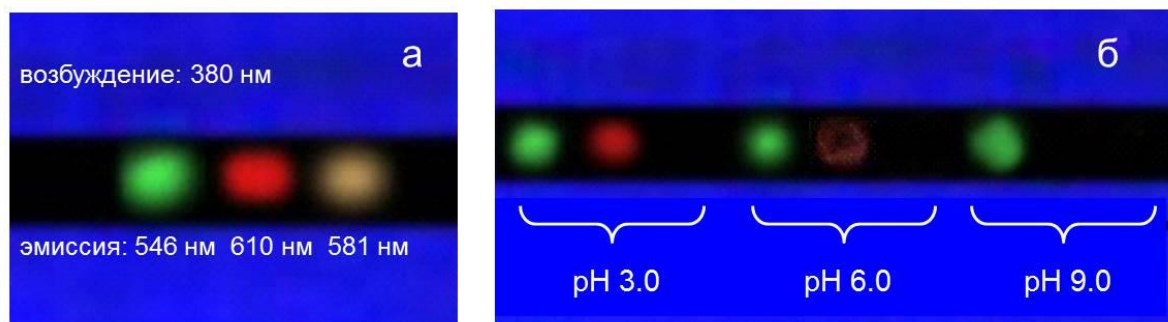


Рисунок 5.57 – Результаты визуализации удерживания меченых квантовыми точками модельных белков (цитохрома С, миоглобина и пепсина) на поверхности кремниевой пластины, модифицированной сополимером анилина с 3-АБК (3:1): а) – непосредственно после нанесения на пластину; б) – после последовательных промывок буферными растворами с различными значениями рН.

Таблица 5.21 - Удерживание меченых квантовыми точками модельных белков (цитохрома С, миоглобина и пепсина) на поверхности кремниевой пластины, модифицированной сополимером анилина с 3-АБК (3:1) при различных значениях рН.

Белок	рI	Цвет	рН 3.0	рН 6.0	рН 9.0
цитохром С	10.3	зеленый	+	+	+
миоглобин	6.9	красный	+	+/-	-
пепсин	2.8	желтый	-	-	-

Параллельно сравнивали способность кремниевых пластин, модифицированных покрытиями синтезированных полимеров, связывать белки с

различными значениями рI, в частности, БСА (рI 4.8), лизоцим (рI 11.3) и пепсин (рI 2.2). Исследовали пластины с ПАНИ-покрытием, с ПАБК-покрытием, полученным путем нанесения и высушивания раствора, с ПАБК-покрытием, полученным хемосорбцией из раствора на силанированной поверхности, а также пластины с покрытиями сополимеров 3-АБК-ПАНИ с различным соотношением звеньев анилина и 3-АБК.

После нанесения на поверхность пластин растворов белков, поверхности промывали трис-НСI буфером (рН 9.0) и водными растворами соляной кислоты (рН 6.0 и рН 3.0). Измеряли оптическую плотность исходных растворов и собранных смывов при $\lambda = 280$ нм. Полученные результаты представлены в Таблице 5.22.

Таблица 5.22 - Удерживание модельных белков (лизоцима, БСА и пепсина) на поверхности кремниевых пластин, модифицированных исследуемыми полимерами при различных значениях рН элюента.

Покрытие	Белок	рI	рН		
			3.0	6.0	9.0
ПАНИ	лизоцим	11.3	22.4	8.7	8.0
	БСА	4.8	60.9	12.5	0
	пепсин	2.2	0	0	0
ПАБК, физически сорбированное покрытие	лизоцим	11.3	0	7	0
	БСА	4.8	23.4	39.1	0
	пепсин	2.2	0	17.5	0
ПАБК, хемосорбированное покрытие	лизоцим	11.3	0	6.7	0
	БСА	4.8	0	7.8	3.9
	пепсин	2.2	0.5	8.2	0
3-АБК-ПАНИ (1:1)	лизоцим	11.3	0.5	9.5	0
	БСА	4.8	24.9	12.5	4.6
	пепсин	2.2	0	0	0
3-АБК-ПАНИ (3:1)	лизоцим	11.3	46.0	26.5	18.4
	БСА	4.8	54.6	12.1	0
	пепсин	2.2	0	0	0

Оказалось, что гомополимеры ПАНИ и ПАБК демонстрируют различные сорбционные свойства в отношении белков. Если на ПАНИ-поверхности значительная доля белков удерживалась при условии, что рI белка превышает рН элюента, то на ПАБК поверхностях (полученных как в результате физической сорбции, так и хемосорбции) эта закономерность не была выявлена. Выявленное различие, по-видимому, определялось катионообменными свойствами ПАБК-покрытий за счет присутствия карбоксильных групп (на хемосорбированных покрытиях, в которых часть кислотных групп участвовала во взаимодействии с

поверхностными аминогруппами силанированной пластины, белки удерживались в наименьшей степени). Было отмечено, что на предварительно силанированных кремниевых пластинах, покрытых слоем сополимера 3-АБК-ПАНИ (1:1), одни и те же белки также удерживались значительно слабее, чем на пластинах, полученных в результате физической сорбции сополимера 3-АБК-ПАНИ (3:1).

Из сравнения полученных результатов следовало, что для решения поставленной задачи в наибольшей степени подходит покрытие 3-АБК-ПАНИ (3:1). Кремниевые пластины, покрытые тремя последовательно нанесенными слоями 3-АБК-ПАНИ (3:1), использовали в качестве «рабочих тел» при проведении «масс-спектрометрии при активированной поверхностью лазерной десорбции/ионизации» (SELDI). На поверхность пластин наносили водные растворы пептидных стандартов (по 4 мкл) и проводили МС-анализ с добавлением «вещества-матрицы» и в отсутствие «матрицы» с целью сравнения эффективности стандартной и усовершенствованной процедур пробоподготовки при анализе в низкомолекулярной области спектра. В экспериментах использовали насыщенные водно-ацетонитрильные (1:1, v/v, с добавлением 0.5 % трифторуксусной кислоты) растворы двух «матриц»: α -циано-4-гидроксикоричной кислоты и 3,5-диметокси-4-гидроксикоричной (синапиновой) кислоты.

На Рисунке 5.58 приведены масс-спектры пептидных стандартов, полученные при использовании кремниевой пластины, модифицированной 3-АБК-ПАНИ, 3:1. Анализ спектров однозначно подтвердил, что разработанное полимерное покрытие проявляет высокую «матричную» активность, в результате чего образуются протонированные молекулярные ионы ($[M+H]^+$). Фоновые пики в масс-спектре при этом отсутствуют. Следует заметить, что бычьего инсулина наносили в 3 и в 10 раз меньше, чем брадикинина и ангиотензина, соответственно.

Добавление «матрицы» к аналиту приводило к появлению интенсивных фоновых пиков в низкомолекулярном диапазоне масс, маскирующих низкомолекулярные фрагменты аналита, что затрудняло анализ низкомолекулярных соединений (Рисунок 5.59).

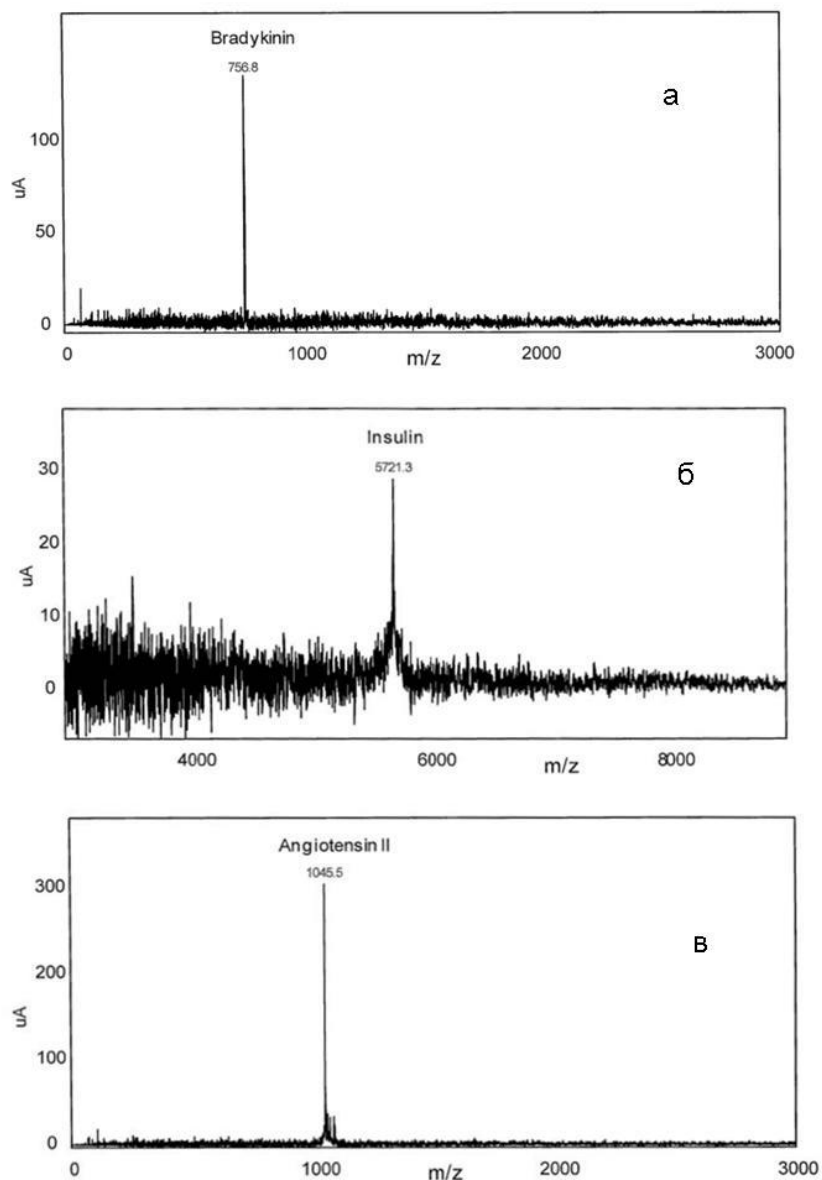


Рисунок 5.58 – Масс-спектры пептидных стандартов (ProteoMass MALDI-MS Standards, Sigma-Aldrich), полученные на спектрометре PS 4000 Enterprise Edition SELDI-MS system (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Водные растворы пептидов (100 пмоль/мкл) наносили на поверхность кремниевых пластин (по 4 мкл) и высушивали. Растворы «веществ-матриц» дважды наносили по 1 мкл, высушивая после нанесения. Спектры получали в одинаковых условиях. а) - масс-спектр ангиотензина II ($M = 1045.5$ Да) на поверхности 3-АБК-ПАНИ без добавления «вещества-матрицы»; б) - масс-спектр бычьего инсулина ($M = 5735$ Да) на поверхности 3-АБК-ПАНИ без добавления «вещества-матрицы»; в) масс-спектр брадикининового фрагмента (1-7 пептид, $M = 756.4$ Да) на поверхности 3-АБК-ПАНИ без добавления «вещества-матрицы».

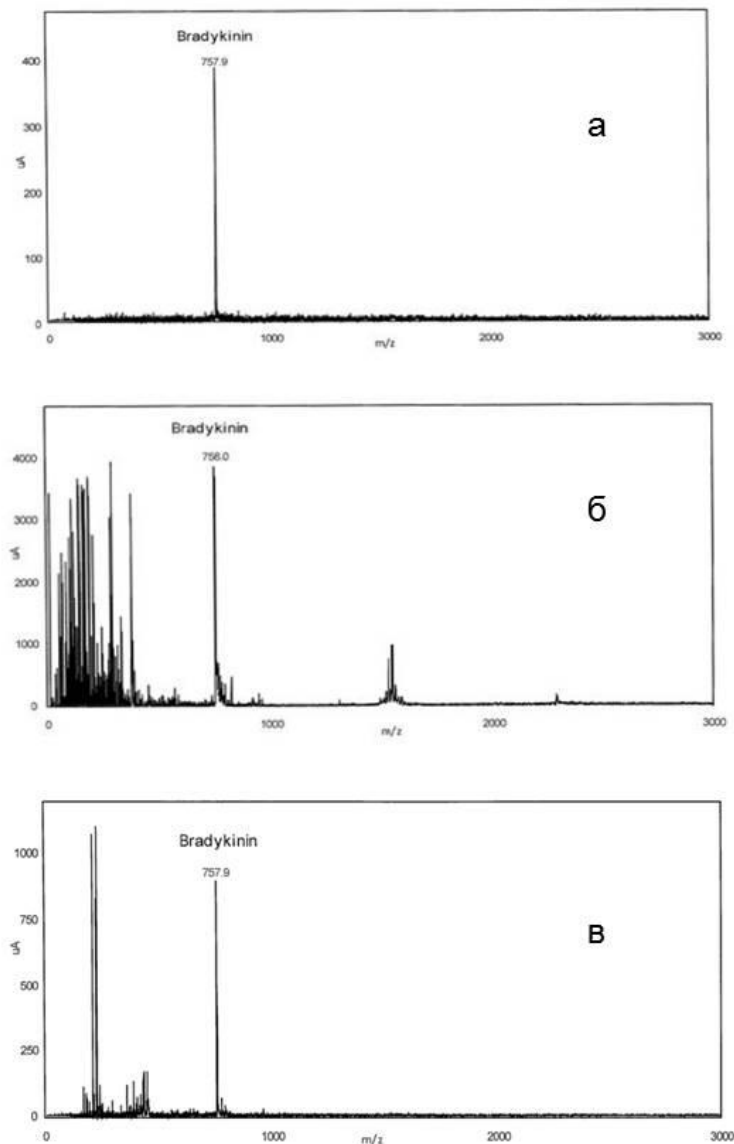


Рисунок 5.59 – Масс-спектры пептидных стандартов (условия проведения анализа указаны в подписи к Рисунку 5.58. а) - масс-спектр брадикининового фрагмента (1-7 пептид, $M = 756.4$ Да) на поверхности 3-АБК-ПАНИ без добавления «вещества-матрицы»; б) - масс-спектр брадикининового фрагмента (1-7 пептид, $M = 756.4$ Да) на поверхности 3-АБК-ПАНИ, «матрица» - α -циано-4-гидроксикоричная кислота; в) - масс-спектр брадикининового фрагмента (1-7 пептид, $M = 756.4$ Да) на поверхности 3-АБК-ПАНИ, «матрица» - синапиновая кислота.

Чтобы доказать, что «матричная активность» обусловлена присутствием полимерного покрытия на поверхности кремниевой пластины, МС-анализ проводили с использованием немодифицированных кремниевых пластин без добавления к аналиту (1-7 фрагменту брадикинина) «вещества-матрицы». Этот тест показал, что наличие пептида в анализируемой пробе в этих условиях, в принципе, может быть

детектировано, однако, интенсивность соответствующего пика снижалась в 5 раз по сравнению с сигналами, полученными с использованием полимермодифицированных кремниевых пластин. Кроме того, в отсутствие полимерного покрытия лазерное излучение вызывало заметное разрушение молекул аналита. В результате в масс-спектре доминировали ионы низкомолекулярных фрагментов, а вследствие сильного расширения (и частичного перекрытия) пиков определение молекулярных масс фрагментов оказалось невозможным (Рисунок 5.60).

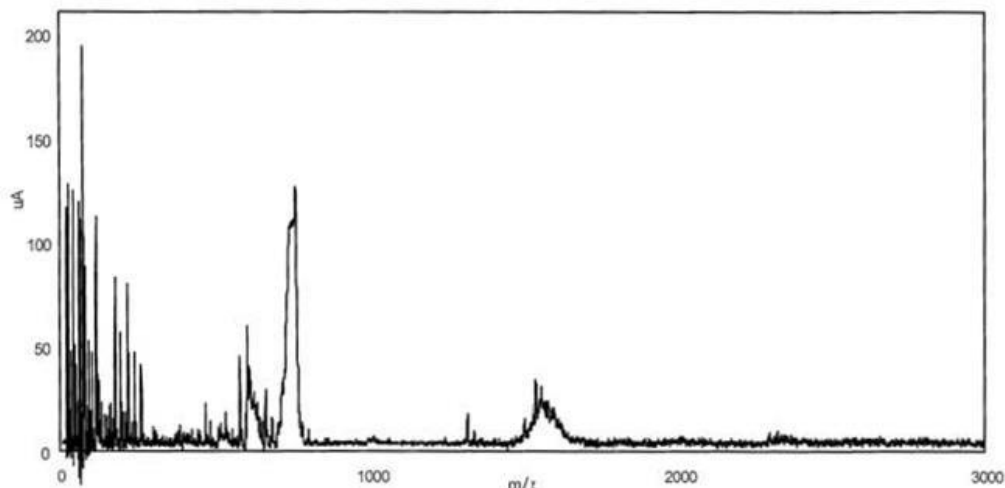


Рисунок 5.60 - Масс-спектр брадикининового фрагмента (1-7 пептид, $M = 756.4$ Да) на кремниевом чипе без покрытия и без добавления «матрицы». Условия проведения анализа указаны в подписи к Рисунку 5.58.

Таким образом, в результате проведенного исследования разработана новая эффективная аналитическая система на основе свойства анилинсодержащих полимерных покрытий селективно удерживать белки (пептиды) в зависимости от значений pI белкового аналита и pH среды, а также способности накапливать энергию лазерного излучения. Разработанная система запатентована [433].

5.6. Области применения разработанных ФП- и ПАНИ-содержащих композитов

В заключение уместно кратко обобщить сведения о применимости разработанных материалов в различных областях молекулярной биотехнологии (Таблица 5.23). Из данных, представленных в Таблице 5.23, следует, что разработанные сорбенты, во-первых, эффективны при проведении ВЭЖХ смесей, содержащих НК и белки (как в аналитическом, так и в препаративном форматах). Во-вторых, эти материалы, в отличие от множества известных ранее, обеспечивают

одностадийное выделение ДНК (и если необходимо, РНК) из разнообразных биологических образцов сложного состава. Одностадийное выделение стало возможным благодаря обнаруженному в результате проведенных исследований эффекту «негативной селекции» в отношении ДНК, который проявляется одновременно с эффектом «позитивной селекции» в отношении белков (пептидов). Сорбционные свойства разработанных материалов также позволяют последовательно выделять предварительно удержанные сорбентом компоненты белковой фракции.

С помощью материалов, модифицированных частично фторированными и анилинсодержащими полимерами (в отличие от перфторированных сорбентов) удается решать ряд дополнительных задач. Так, нанопокрyтия на основе частично фторированных полимеров с активными функциональными группами пригодны для иммобилизации биомолекул. Кроме того, ФП-содержащие материалы перспективны для выделения низкомолекулярных БАВ (например, витаминов) из биологических образцов. Композиты, полученные в результате нанесения нанопокрyтий на основе ПАНИ, 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.

Таблица 5.23 - 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
1	2	3	4	5	6
Основные применения					
разделение смесей НК и белков в ВЭЖХ-формате [137, 367, 434]	+	+	+	+	+

1	2	3	4	5	6
одностадийное выделение ДНК (РНК) из сложных смесей картриджным методом или с помощью МК [338, 339, 352-355, 359, 360, 382, 384, 385, 388, 435-439]	+	+	+	+	+
Специальные задачи					
разделение белковых смесей [344, 357, 433]	+	+	+	+	+
иммобилизация биолигандов [356, 358]	-	+	-	-	-
рабочие тела для масс-спектрометрии [433]	-	-	+	+	+
разделение смесей <i>он</i> - и <i>дн</i> НК [356]	-	-	-	+	+
очистка ПЦР-фрагментов [356]	-	-	-	-	+
анализ содержания витаминеров в крови [427]	-	+	-	-	-

* * *

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 удастся 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 нанокомпозитов 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 фторполимер- 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 микропатогенов (вирусы, бактерии) из указанных образцов с целью ранней диагностики заболеваний, а также очистки, хранения и транспортировки биологических проб. Таким образом, разработанные фторполимер- 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 полиарамид-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 *TTV*), 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.

7. ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1

Заключение ООО «НПФ Генлаб» (г. Москва) об эффективности применения мембранного сорбента для ускоренной ПЦР-диагностики возбудителей инфекционных заболеваний человека.

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственная фирма «Генлаб»
ИНН/КПП 7730509322/773001001
117246, г.Москва, Научный проезд, д.10, оф.405, 410, 502, 504; т/ф 8-499-744-46-06
e-mail: genlab@rambler.ru, www.genlab.ru

г.Москва

17, 12, 2014

Заключение.

о результатах сравнительных испытаний метода пробоподготовки ЛПБ-1, основанного на использовании мембран, модифицированных нанослоями полианилинов, для одностадийного выделения и очистки ДНК из клинических образцов для ПЦР-диагностики патогенов человека.

В лаборатории компании ООО «НПФ «Генлаб» (г.Москва, Россия) были проведены сравнительные испытания разработанного в лаборатории «Полимеры для биологии» метода пробоподготовки (одностадийное выделение ДНК патогенов человека из клинических проб – соскобов слизистой и биологических жидкостей) «ЛПБ-1». В качестве метода сравнения применяли коммерческий набор пробоподготовки Diatom™ DNA Prep 100 (ООО «Лаборатория Изоген»). Испытания проводили на клинических образцах, отобранных методом случайной выборки у десяти пациентов. Присутствие в пробах ДНК возбудителей урогенитальных инфекций определяли методом ПЦР с помощью мультипраймерного набора «Мультиген-4» (ООО «НПФ «Генлаб»)

Результаты. Показано, что пробоподготовка "ЛПБ-1" благодаря одностадийной процедуре выделения ДНК обеспечивает более высокую степень очистки выделяемой ДНК, что подтверждается более высокой чувствительностью ПЦР (более четкая визуализация внутреннего стандарта), таким образом, снижая вероятность получения ложноотрицательных результатов, а так же требует меньше времени для проведения анализа по сравнению с многостадийным стандартным методом.

Выводы по результатам сравнительных испытаний. На основании анализа результатов испытаний можно рекомендовать пробоподготовку "ЛПБ-1" для выделения и очистки ДНК из клинических проб (соскобы слизистой и биологические жидкости) для последующего проведения эффективной ПЦР-диагностики возбудителей инфекционных заболеваний человека.

Руководитель испытательной лаборатории
Генеральный директор ООО «НПФ «Генлаб»



Воронцова Н.И. /Воронцова Н.И./

Земляная Н.Ю. /Земляная Н.Ю./

Заключение ООО «НПФ Генлаб» (г. Москва) об эффективности применения мембранного сорбента для ускоренной ПЦР-диагностики возбудителей инфекционных заболеваний человека.

Общество с ограниченной ответственностью «Научно-производственная фирма Генлаб»
ИНН/КПП 7730509322/773001001
117246, Г. Москва, Научный проезд, д. 10, оф. 405, 410, 502, 504; т/ф 8-499-744-46-06
e-mail: genlab@rambler.ru, www.genlab.ru

г. Москва

19 марта 2015 г.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

о результатах сравнительных испытаний метода пробоподготовки «ЛПБ-1», основанного на использовании *синтетических мембран, модифицированных нанослоями полианилина*, для одностадийного выделения и очистки ДНК из клинических образцов для ПЦР-диагностики патогенов человека.

В лаборатории ООО «НПФ Генлаб» (г. Москва) были проведены сравнительные испытания разработанного в лаборатории «Полимеры для биологии» ИБХ РАН метода пробоподготовки (одностадийного выделения ДНК патогенов человека из клинических проб и биологических жидкостей).

В качестве метода сравнения использовали коммерческий набор для пробоподготовки Diatom™DNA Prep 100 (ООО «Лаборатория Изоген»).

Испытания проводили на клинических образцах, случайным образом отобранных у десяти пациентов. Присутствие в пробах, отобранных из ротовой полости, ДНК патогенов определяли методом ПЦР с помощью мультипраймерного набора «Мультиген-4» (ООО «НПФ Генлаб»).

Результаты испытаний

Испытания показали, что протестированная пробоподготовка, основанная на одностадийной процедуре выделения ДНК, одновременно обеспечивает высокий выход ДНК и высокую степень очистки ДНК, что значительно уменьшает вероятность получения ложноотрицательных результатов. Сама процедура пробоподготовки по сравнению с методикой, взятой для сравнения, требует меньше времени для выделения очищенной ДНК (в частности, на непосредственный контакт лизированных образцов с сорбентом, обеспечивающий выделение и очистку ДНК при использовании предложенного метода, требуется всего 3 мин).

Выводы по результатам сравнительных испытаний

Можно рекомендовать пробоподготовку, проводимую с использованием мембранных сорбентов, для выделения и очистки ДНК из клинических проб (лизаты соскобов слизистой и биологических жидкостей) для ускоренной ПЦР-диагностики возбудителей инфекционных заболеваний человека.

Руководитель испытательной лаборатории
Генеральный директор ООО «НПФ Генлаб»

Воронцова Н.И.

Земляная Н.Ю.



Заключение ООО «Амбер» (г. С.-Петербург) об эффективности применения гофрированного мембранного сорбента для ускоренной ПЦР-диагностики возбудителей инфекционных заболеваний человека.

Научно-производственная компания "Амбер"

г. Санкт-Петербург
 Научные исследования и разработки в области естественных наук
 Лабораторная диагностика
 Методическое и техническое сопровождения НИР
 Научный консалтинг
 Патентные исследования

ООО «Амбер»
 Юридический адрес
 192239, г. Санкт-Петербург,
 ул. Будапештская д. 63, корп. 1., оф. 29
 Фактический адрес
 197183, г. Санкт-Петербург,
 Приморский проспект д.6, офис 27Н
 тел. руководителя 8 (911) 731-85-98
 тел./факс лаборатории 8 (812) 340-50-37
 эл. почта: ambergroup@mail.ru
 ОКПО 98546239, ОГРН 1069847548121
 ИНН/ КПП 7816403840/781601001

25 декабря 2014 г. № 1п/10

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

о результатах сравнительных испытаний метода пробоподготовки «ЛПБ-2», основанного на использовании *гофрированных мембран, модифицированных нанослоями полианилина*, для одностадийного выделения и очистки ДНК из клинических образцов для ПЦР-диагностики патогенов человека.

В лаборатории ООО «Амбер» (г. Санкт-Петербург, Россия) проводились сравнительные испытания разработанного в лаборатории «Полимеры для биологии» ИБХ РАН метода пробоподготовки (одностадийного выделения ДНК патогенов человека из клинических проб – биологических жидкостей) «ЛПБ-2».

В качестве метода сравнения использовали коммерческий набор для выделения геномной ДНК из крови человека или животных фирмы Axugen (США).

Испытания проводили на клинических образцах, случайным образом отобранных у десяти пациентов. Присутствие в пробах ДНК возбудителя *Mycoplasma hominis* определяли методом ПЦР с помощью набора ПЦР-РВ Mh96 производства фирмы «Амбер» (Россия).

Результаты испытаний и выводы

Показано, что пробоподготовка «ЛПБ-2», основанная на одностадийной процедуре выделения ДНК, обеспечивает высокий выход ДНК и высокую степень очистки, что снижает вероятность получения ложноотрицательных результатов. Процедура пробоподготовки «ЛПБ-2» по сравнению с методикой, взятой для сравнения, требует меньше времени для выделения очищенной ДНК. Так, непосредственный контакт лизированных образцов с сорбентом, обеспечивающий выделение и очистку ДНК при использовании метода «ЛПБ-2», отнимает 3 мин, в то время как стандартная

процедура выделения требует 90 мин. Протестированный набор пригоден для проведения пробоподготовки клинических материалов для последующей ПЦР диагностики.

Генеральный директор

ООО "Амбер"



Старцев Вениамин Александрович

БЛАГОДАРНОСТИ

В представленной диссертации проанализированы и обобщены результаты исследований, проведенных в течение ряда лет на стыке различных научных дисциплин. Многие из этих результатов были получены благодаря совместным усилиям автора и его коллег как из ИБХ РАН, так и из различных отечественных и зарубежных лабораторий и научно-производственных компаний в рамках выполнения совместных научных проектов. Автор считает своим долгом выразить искреннюю признательность и благодарность всем участникам этих исследований.

Прежде всего, я благодарю своего руководителя, наставника и научного консультанта проф. д.х.н. В.П. Зубова за потрясающе грамотное и профессиональное координирование всех этапов выполненной работы, за постоянную и всестороннюю поддержку, плодотворные дискуссии по любым возникающим вопросам и за неоценимую помощь в формулировании направлений проведенных исследований.

Я искренне признателен моим первым учителям – проф. д.х.н. И.А. Грицковой (зам. зав. кафедры высокомолекулярных соединений, Московский технологический университет, МИТХТ) – за то, что она привила мне любовь к исследованиям на стыке научных дисциплин, и к.х.н. В.В. Сабурову (лаборатория «Полимеры для биологии», ИБХ РАН) – за то, что с момента нашего первого знакомства он позволил мне самостоятельно выбирать направления исследований и обеспечил условия для их реализации.

Выражаю искреннюю признательность всем моим коллегам из лаборатории «Полимеры для биологии» ИБХ РАН (настоящим и бывшим) за творческое и плодотворное участие в совместной экспериментальной работе и в обсуждении полученных результатов: к.х.н. Е.Ю. Ягудаевой, к.х.н. А.И. Простяковой, к.х.н. А.Н. Генераловой, к.х.н. А.А. Вихрову, к.х.н., И.В. Гороховой, к.х.н. С.В. Сизовой, к.х.н. Л.С. Жигис, к.х.н. А.Н. Бурякову, к.х.н. А.Е. Иванову, О.А. Разгуляевой, к.б.н. В.С. Зуевой, †к.х.н. П.Д. Решетову. Я очень благодарен коллегам из других подразделений ИБХ РАН за их интерес к моей работе, участие в проведенных исследованиях по различным направлениям и предоставление образцов для исследований: д.х.н. проф. Т.В. Овчинниковой и к.б.н. Л.Л. Заваде (Учебно-научный центр), чл.-корр. РАН проф. С.К. Завриеву, к.б.н. Д.Ю. Рязанцеву, к.б.н. А.А. Стахееву (Лаборатория молекулярной диагностики), к.х.н. Е.М. Рапопорт (Лаборатория углеводов), к.х.н. О.Е. Трубецкой (Группа молекулярной экологии).

Я благодарю студентов и аспирантов, в разные годы работавших в лаборатории «Полимеры для биологии» ИБХ РАН, без личного практического вклада которых не удалось бы охватить все представленные в диссертации направления: Зыбина Д.И., Букину Я.А., Брыкову Н.А., Садыкова Т.Ф., Ионова М.А., Примак Н.В., Макееву И.А., Крапивину Н.К., Мушникову Ю.В., Николаеву Е.И., Белусь С.К., Ерохину Л.И., Кузнецову Д.П., Борисову А.Е., Крымова П.С.

Я искренне благодарен всем коллегам из российских и зарубежных институтов и компаний, которые в течение ряда лет помогали реализовывать задуманное исследование: Н.Н. Пономареву и к.х.н. Г.Б. Барсамяну (НИЦ «Курчатовский институт»), д.х.н. М.Р. Муйдинову (Институт проблем химической физики РАН), д.б.н., чл.-корр. РАН Н.А. Зиновьевой (ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства), д.б.н. А.С. Солонину, к.б.н. М.В. Захаровой, к.б.н. Т.В. Юрковой (Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН), д.х.н. †Г. Балаяну (НИИ «Химтех», Армения), к.х.н., чл.-корр. РАЕН А.В. Тарасову, к.х.н. чл.-корр. РАЕН Ю.А. Федотову (ООО НПП «Технофильтр»), к.б.н. Н.И. Воронцовой с сотр. (ООО «НПФ Генлаб»), В.А. Старцеву с сотр. (ООО «Амбер»), д.х.н. В.И. Белоглазову, к.х.н. Ю.С. Скибиной с сотр. (ООО НПП «Наноструктурная технология стекла»), д.х.н. проф. В.Б. Тверскому, д.х.н., проф. А.А. Ищенко (Московский технологический университет, МИТХТ), чл.-корр. РАН д.м.н. Урываеву Л.В., д.м.н. Бурцевой Е.И., д.м.н. В.Т. Ивановой с сотр. (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ), Dr. Prof. I. Bruce (Кентский университет, Великобритания), Prof. G. Brem, Dr. Lutz Plobner, Dr. Prof. R.-M. Leiser с сотр. (Agrobiogen GmbH, Германия), Dr. A. Walter, Dr. M. Lueck (Prologo Biochemie GmbH, Германия), Dr. P. Bachmann, Dr. C. Ribbing (Philips Research Aachen, Германия), Dr. Prof. D.-J. Liaw с сотр. (Национальный тайваньский университет науки и технологии, Тайвань) – за предоставленную ими возможность пользоваться великолепной технологической базой и интеллектуальную поддержку при решении возникающих нетривиальных задач, а также за творческую атмосферу при обсуждении результатов проведенных исследований.

Также я выражаю благодарность моей семье за поддержку, бесконечное терпение и понимание, которые я постоянно ощущал, работая над диссертацией.

СПИСОК ЦИТИРОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Glick B.R., Pasternak J.J. *Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA*. 3rd ed. – 2005. - Washington, D. C.: ASM Press. - 584 p.
2. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семенов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. ПЦР в реальном времени / Под ред. Д.В. Ребрикова. - 2009. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. 223 с.
3. Маккреди Б.Дж., Чимера Д.А. Обнаружение и идентификация патогенных микроорганизмов молекулярными методами // Молекулярная клиническая диагностика. Методы / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – 1999. – М.: Мир. С. 496-506.
4. Ridly A.M. Genomic Fingerprinting by Application of rep-PCR // *Methods in Molecular Medicine*, V. 15. *Molecular Bacteriology Protocols and Clinical Applications* / N. Woodford and A.P. Johnson (ed.). – 1998. – Totowa, NJ: Humana Press Inc. P.103–115.
5. Гарафутдинов Р.Р. Новые методы детекции олигонуклеотидных замен и общие принципы ДНК-идентификации личности на основе генетического штрих-кодирования: дис. ... докт. биол. наук. Уфа, 2006. 123 с.
6. Лопухов Л.В., Эйдельштейн М.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микробиологической диагностике // *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. – 2000. – Т.2. - №3. С. 96-106.
7. Miescher, Friedrich. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen // *Medicinisch-chemische Untersuchungen*. 1871. –V. 4. P. 441–460.
8. Meselson M., Stahl F.W. The replication of DNA in *Escherichia coli* // *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*. — 1958. — V. 44(7). P. 671—682.
9. Sambrook J., Russel D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. – 2001. - Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY. 2100 p.
10. Marko M.A., Chipperfield R., Birnboim H.C. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder // *Anal. Biochem.* – 1982 – 121. P. 382–387.
11. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on // *Nature Protocol*. – 2006 – 1(2). p. 581–585.

12. Albertson P.-A. Partion of cell and macromoleculs. Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes and cell in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. 3rd Ed. – NY: J. Wiley & Sons. - 1986. - 346 p.
13. Carr S.M., Griffiths O.M. Rapid isolation of animal mitochondrial-DNA in a small fixed-angel rotor at ultrahigh speed // *Biochemical Genetics*. – 1987 – 25. P. 385-390.
14. Perez-Ramirez B., Steckert J.J. Probing Reversible Self-Association of Therapeutic Proteins by Sedimentation Velocity in the Analytical Ultracentrifuge // *Therapeutic Proteins: Methods and Protocols* / C.M. Smales and D.C. James (Eds.). – 2005 – Totowa, NJ: Humana Press. V. 308. P. 301-318.
15. Noles S.R. Traditional methods for CsCl isolation of plasmid DNA by ultracentrifugation // *Thermo Scientific, application note AN-LECF-PLASDNA-0408*. – 2008. - P. 1-4.
16. Crouse J, Amorese D. Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate // *Focus*. – 1987. - 9(2). P. 3–5.
17. Zeugin J.A., Hartley J.L. Ethanol Precipitation of DNA // *Focus*. – 1985 - 7(4). P.1–2.
18. Paithankar K.R., Prasad K.S. Precipitation of DNA by polyethylene-glycol and ethanol // *Nucleic Acids Res*. – 1991 – 19(6). P.1346.
19. Janson J.-Ch. Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications. 3rd edition. – 2011. - John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ. 548 p.
20. Rother D., Sen T., East D., Bruce I.J. Silicon, silica and its surface patterning/activatin with alkoxy- and amino-silanes for nanomedical applications // *Nanomedicine*. – 2011 – 6(2). P. 281-300.
21. Tan S.C., Yiap B.C. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *J. Biomed. Biotechnol*. – 2009. - № 574398. P. 1-10.
22. Berensmeier S. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. – 2006. – V. 73(3). P. 495-504.
23. Антонова О.С., Корнева Н.А., Белов Ю.В., Курочкин В.Е.. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (обзор) // *Научное приборостроение* – 2010. – Т. 20, № 1. С 3–9.

24. Kong M.Li, Laurent P.R., Stephen J.C. Solid-Phase Extraction (SPE) Techniques for Sample Preparation in Clinical and Pharmaceutical Analysis: A Brief Overview // *Current Pharmaceutical Analysis*. – 2006. – V. 2(2). P. 95-102.
25. Durhan E.J., Lukasewycz M.T., Amato J.R.. Extraction and concentration of nonpolar organic toxicants from effluents using solid phase extraction // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 1990. - V. 9(4). P. 463-466.
26. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. - 1985. - М.: Наука, 536 с.
27. Kuske C.R. Banton K.L., Adorada D.L., Stark P.C., Hill K.K., Jackson P.J. Small-Scale DNA Sample Preparation Method for Field PCR Detection of Microbial Cells and Spores in Soil // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1998. - V. 64(7). P. 2463-2472.
28. Yamamoto N., Matsuzaka Y., Kimura M., Matsuki H., Yanagisawa Y. Comparison of dry- and wet-based fine bead homogenizations to extract DNA from fungal spores // *J. of Bioscience and Bioengineering*. – 2009. – V. 107(4). P. 464-470.
29. Heller M.J., Robinson R.A., Burgart L.J., Teneyck C.J., Wilke W.W. DNA extraction by sonication – a comparison of fresh, frozen, frozen, and paraffin-embedded tissues extracted for use in polymerase chain-reaction assays // *Modern Pathology*. – 1992. – V. 5(2). P. 203-206.
30. Marentis T.C., Kusler B., Yaralioglu G.G., Liu S.J., Haeggstrom E.O., Khuri-Yakub B.T. Microfluidic sonicator for real-time disruption of eukaryotic cells and bacterial spores for DNA analysis // *Ultrasound in Medicine and Biology*. – 2005. – V. 31. P. 1265-1277.
31. Abdel-Latif A., Osman G. Comparison of three genomic DNA extraction methods to obtain high DNA quality from maize // *Plant Methods*. - 2017. - 13:1. URL: <https://plantmethods.biomedcentral.com/track/pdf/10.1186/s13007-016-0152-4> [Дата обращения: 12.08.2019].
32. Zhou J., Bruns M.A., Tiedje J.M. DNA recovery from soils of diverse composition // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – V. 62. P. 316–322.
33. Sekikawa T., Kawasaki Yu., Katayama Y., Iwahori K. A simple method for extracting DNA from *Cryptosporidium* oocysts using the anionic surfactant LSS // *New Biotechnology*. – 2011. – V. 29(1). P. 139-143.
34. Chacon-Cortes D., Griffiths L.R. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives // *Journal of Biorepository Science for Applied Medicine*. - 2014. - V. 2. P. 1-9.

35. Braid M.D., Daniels L.M., Kitts C.L. Removal of PCR inhibitors from soil DNA by chemical flocculation // *J. of Microbiological Methods*. – 2003. – V. 52(3). P. 389-393.
36. Elkins K.M. DNA Extraction. In: *Forensic DNA Biology: A Laboratory Manual*. – 2013. - Academic Press. 224 p.
37. Ikuta K., Maruo S., Fujisawa T., Yamada A. Micro concentrator with opto-sense micro reactor for biochemical IC chip family - 3D composite structure and experimental verification // *MEMS'99: Twelfth IEEE international conference on micro electro mechanical systems, technical digest*. In: *Proceedings IEEE Micro Electro Mechanical Systems*. Orlando: - 1999. - P. 376-381.
38. Cabrera C.R., Yager P. Continuous concentration of bacteria in a microfluidic flow cell using electrokinetic techniques // *Electrophoresis*/ - 2001, - V. 22(2). P. 355-362.
39. Chockalingam P.S., Jurado L.A., Jarrett H.W. DNA affinity chromatography // *Molecular Biotechnology*. – V. 19(2). –P. 189-199.
40. Smith J.S., Johnson F.B. Isolation of G-Quadruplex DNA Using NMM-Sepharose Affinity Chromatography // *Methods in Molecular Biology (Clifton N.J.)*. V. 608. – P. 207-221.
41. Xiang F., Lin Y.H., Wen J., Matson D.W., Smith R.D. An integrated microfabricated device for dual microdialysis and on-line ESI ion trap mass spectrometry for analysis of complex biological samples. *Anal Chem.*, 1999, v.71, p.1485-1490.
42. Goloub T.P., Koopal L.K, Bijsterbosch B.H, Sidorova M.P. Adsorption of cationic surfactants on silica. Surface charge effects // *Langmuir*. – 1996. - V.12(13). P. 3188–3194.
43. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. – 2008. – NY, USA: W.H. Freeman and Company. – 1130 p.
44. Gelbart W.M., Bruinsma R.F., Pincus P.A., Parsegian V.A. DNA-inspired electrostatics // *Phys. Today*. – 2000. – V. 53(9). P. 38–44.
45. Fogolari F., Brigo A., Molinari H. The Poisson–Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: a tool for structural biology // *J. of Molecular Recognition*. – 2002. – V. 15(6). P. 377–392.
46. Melzak K.A., Sherwood C.S., Turner R.F.B., Haynes C.A. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solution // *J. of Colloid Interface Sci*. – 1996. - V. 181(2). P. 635–644.

47. Beld M., Sol C., Goudsmit J., Boom R. Fractionation of nucleic acids into single-stranded and double-stranded forms // *Nucl. Acids Res.* – 1996. - V. 24(13). P. 2618-2619.
48. Петров Д.Г., Макарова Е.Д., Корнева Н.А., Альдекеева А.С., Князьков Н.Н. Воздействие полей разной природы на выход ДНК при выделении из модельных растворов на двуокиси кремния. I. Влияние температуры // *Научное приборостроение.* - 2015. - Т. 25, № 2. С. 91-101.
49. Magnani M., Galuzzi L., Bruce I.J.. The use of magnetic nanoparticles in the development of new molecular detection systems // *J. Nanosci. Nanotech.* – 2006. - V. 6(8). P. 2302-2311.
50. Sen T., Bruce I.J. Mesoporous silica-magnetite nanocomposites: fabrication, characterization and application in biosciences // *Microporous Macroporous Mater.* – 2009. – V. 120(3). P. 246-251.
51. Taylor J.I., Hurst C.D., Davies M.J., Sachsinger N., Bruce I.J. Application of magnetite and silica-magnetite composites to the isolation of genomic DNA // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – V. 890(1). P. 159-166.
52. Odenbach S. *Colloidal Magnetic Fluids: Basics, Development and Application of Ferrofluids.* - 2009. - Heidelberg, Germany: Springer.
53. Bruce I.J., Taylor J., Todd M., Davies M.J., Borioni E., Sangregorio C., Sen T. Synthesis, characterization and application of silica-magnetite nanocomposites // *J. of Magnetism and Magnetic Materials.* – 2004. – V. 284. P. 145-160.
54. Amagliani G., Brandi G., Omiccioli E., Casiere A., Bruce I.J., Magnani M. Direct detection of *Listeria monocytogenes* from milk by magnetic based DNA isolation and PCR // *Food Microbiol.* – 2004.- V. 21(5). P. 597-603.
55. Sebastianelly A., Sen T., Bruce I.J. Extraction of DNA from soil using nanoparticles by magnetic bioseparation // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2008. – V. 46(4). P. 488-491.
56. Bertozzini E., Penna A., Pierboni E., Bruce I.J., Magnani M. Development of new procedures for the isolation of phytoplankton DNA from fixed samples // *J. Appl. Phycol.* – 2005. – V. 17. P. 223-229.
57. Henco K., Stichel A., Colpan M. Method for separating long-chain nucleic acids. US 5057426 A. 15.10.1991.
58. Smith C.E., Holmes D.L., Simpson D.J., Katzenhändler J., Bitner R.M., Grosh J.C. pH dependent ion exchange matrix and method of use in the isolation of nucleic acids. US 6310199 B1. 30.10.2001.

59. Reitan E.H., Deggerdal A., Skagestad V. Method for sequentially isolating DNA and RNA from the same nucleic acid-containing sample, WO 2004/108925. 16.12.2004.
60. URL: http://www.rosmed.ru/scatalog/show/7860/PCR_analizator_Cobas_AmpliPrep [дата обращения: 20.12.2018].
61. URL: https://agtc.med.wayne.edu/pdfs/qiasymphony_sp_brochure.pdf [дата обращения: 15.08.2018].
62. Kruhøffer M., Dyrskjøt L., Voss T., Lindberg R.L.P., Wyrich R., Thykjaer T., Orntoft T.F. Isolation of Microarray-Grade Total RNA, MicroRNA, and DNA from a Single PAXgene Blood RNA Tube // *J. Mol. Diagn.* – 2007. – V. 9(4). P. 452–458.
63. URL: https://www.fishersci.com/content/dam/fishersci/en_US/documents/programs/scientific/brochures-and-catalogs/brochures/thermo-scientific-kingfisher-nucleic-acid-brochure.pdf [дата обращения: 07.08.2018].
64. URL: https://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/ApplicationNotes/AN_NS896Tissue_CBXtractor.pdf [дата обращения: 16.07.2018].
65. McNeil J., Ecker D., Hofstadler S.A., Blyn L., Gesser I., Cummins L.L., Goates A., Drader J.J. Automatic identification of bioagents. WO/2005/009202. 03.02.2005.
66. Baggio R.F., Gagne Jr. G.A., Manjula c/o Millipore Corporation Aysola, Julie R. c/o Millipore Corporation Murrell. Filter device for the isolation of a nucleic acid. EP 1873242A3. 09.01.2008.
67. Bridenbaugh R., Dang W., Bussey L. Methods for purifying nucleic acids. WO/2000/005358. 03.02.2000.
68. Stevenson A., Potts A., Donovan D., Baker M. Nucleic acid isolation. WO/2005/012521. 10.02.2005.
69. Wen J., Legendre L.A., Bienvenue J.M., Landers J.P. Purification of Nucleic Acids in Microfluidic Devices // *Anal. Chem.* – 2008. – V. 80. P. 6472–6479.
70. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // *J. of Clinical Microbiology.* – 1990. – V. 28(3). P. 495-503.
71. McCormick R.M. A solid-phase extraction procedure for DNA purification // *Anal. Biochem.* – 1989. – V. 181. P. 66-74.
72. Christel L.A., Petersen K., McMillan W., Northrup M.A. Rapid, automated nucleic acid probe assays using silicon microstructures for nucleic acid concentration //

- Journal of Biomechanical Engineering - Transactions of the ASME. – 1999. – V. 12. P. 22-27.
73. Cady N.C., Stelick S., Batt C.A. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures // *Biosensors & Bioelectronics*. – 2003. – V. 19(1). P. 59-66.
74. Hindson B., Gutierrez D.M., Ness K.D., Makarewicz A.J., Metz T.R., Setlur U.S., Benett W.B., Loge J.M., Colston B.W., Francis P.S., Barnett N.W., Dzenitis J.M. Development of an automated DNA purification module using a microfabricated pillar chip // *Analyst*. – 2008. – V. 133(2). P. 248-255.
75. Tian H.J., Huhmer A.F.R., Landers J.P. Evaluation of silica resins for direct and efficient extraction of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format // *Analytical Biochemistry*. – 2000. – V. 283(2). P. 175-191.
76. Wolfe K.A., Breadmore M.C., Ferrance J.P., Power M.E., Conroy J.F., Norris P.M., Landers J.P. Toward a microchip-based solid-phase extraction method for isolation of nucleic acids // *Electrophoresis*. – 2002. – V. 23(5). P. 727-733.
77. Breadmore M.C., Wolfe K.A., Arciba I.G., Leung W.K., Dickson D., Giordano B.C., Power M.E., Ferrance J.P., Feldman S.H., Norris P.M., Landers J.P. Microchip-based purification of DNA from biological samples // *Analytical Chemistry*. – 2003. – V. 75(8). P. 1880-1886.
78. Bienvenue J.M., Duncalf N., Marchiarullo D., Ferrance J.P., Landers J.P. Microchip-based cell lysis and DNA extraction from sperm cells for application to forensic analysis // *Journal of Forensic Sciences*. – 2006. – V. 51(2). P. 266-273.
79. Wu Q., Bienvenue J.M., Hassan B.J., Kwok Y.C., Giordano B.C., Norris P.M., Landers J.P., Ferrance J.P. Microchip-based macroporous silica sol-gel monolith for efficient isolation of DNA from clinical samples // *Analytical Chemistry*. – 2006. – V. 78(16). P. 5704-5710.
80. Chung Y.C., Jan M.S., Lin Y.C., Lin J.H., Cheng W.C., Fan C.Y. Microfluidic chip for high efficiency DNA extraction // *Lab on a Chip*. – 2004. – V. 4(2). P. 141-147.
81. URL:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/ZTC18S?lang=en®ion=RU>
[дата обращения: 10.12.2018].
82. Svec F., Frechet J.M.J. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid-chromatography separation media // *Analytical Chemistry*. – 1992. – V. 64(7). P. 820-822.

83. Moshimara K., Bennett B.D., Dulay M.T., Quirino J.P., Zare R.N. Toward sol-gel electrochromatographic separations on a chip // *Journal of Separation Science*. – 2002. – V. 25(15-17). P. 1226-1230.
84. Wen J., Guillo C., Ferrance J.P., Landers J.P. DNA extraction using a tetramethyl orthosilicate-grafted photopolymerized monolithic solid phase // *Analytical Chemistry*. – 2006. – V. 78(5). P. 1673-1681.
85. Wen J., Guillo C., Ferrance J.P., Landers J.P. Microfluidic-based DNA purification in a two-stage, dual-phase microchip containing a reversed-phase and a photopolymerized monolith // *Analytical Chemistry*. – 2007. – V. 79(16). P. 6135-6142.
86. Bhattacharyya A., Klapperich C.M. Thermoplastic microfluidic device for on-chip purification of nucleic acids for disposable diagnostics // *Analytical Chemistry*. – 2006. – V. 78(3). P. 788-792.
87. Тенникова Т.Б. Высокоэффективная мембранная хроматография: формирование структуры порового пространства полимерных носителей для межфазового распределения белков: дис. ... докт. хим. наук. Москва, 1998. 177 с.
88. Сеницына Е.С., Власова Е.Н., Влах Е.Г., Тенникова Т.Б. Монолитные метакрилатные полимерные сорбенты: разработка методов химической модификации поверхности для последующей биоаффинной функционализации // *Журнал прикладной химии*. – 2008. – Т. 81, № 8. С. 1326-1332.
89. Сеницына Е.С. Полимерные монолитные материалы для биочипов с контролируемой пористостью и различными реакционноспособными группами: дис. ... канд. хим. наук. Санкт-Петербург, 2014. 141 с.
90. Nakagawa T., Tanaka T., Niwa D., Osaka T., Takeyama H., Matsunaga T. Fabrication of amino silane-coated microchip for DNA extraction from whole blood // *J. of Biotechnology*. – 2005. – V. 116(2). P. 105-111.
91. Ogawa R., Kaji N., Hashioka S., Baba Y., Horiike Y. Fabrication and characterization of quartz nanopillars for DNA separation by size // *Japanese journal of applied physics part 1 - regular papers brief communications & review papers*. – 2007. – V. 46(4B). P. 2771-2774.
92. Cao W.D., Christopher C.J., Ferrance J.P., Landers J.P. Chitosan as a polymer for pH-induced DNA capture in a totally aqueous system // *Analytical Chemistry*. – 2006. – V. 78(20). P. 7222-7228.

93. Witek M.A., Lopis S.D., Shawn D., Wheatley A., McCarley R.L., Soper S.A. Purification and preconcentration of genomic DNA from whole cell lysates using photoactivated polycarbonate (PPC) microfluidic chips // *Nucleic Acids Research.* – 2006. – V. 34(10). Article number: e74.
94. Witek M.A., Hupert M.L., Park D. S.-W., Fears K., Murphy M.C., Soper S.A. 96-well polycarbonate-based microfluidic titer plate for high-throughput purification of DNA and RNA // *Analytical Chemistry.* – 2008. – V. 80(9). P. 3483-3491.
95. Kim J., Voelkerding K.V., Gale B.K. Patterning of a nanoporous membrane for multi-sample DNA extraction // *Journal of Micromechanics and Microengineering.* – 2006. – V. 16(1). P. 33-39.
96. Jiang G.F., Harrison D.J. mRNA isolation in a microfluidic device for eventual integration of cDNA library construction // *Analyst.* – 2000. – V. 125(12). P. 2176-2179.
97. Satterfield B.C., Stern S., Caplan M.R., Hukari K.W., West J.A.A. Microfluidic purification and preconcentration of mRNA by flow-through polymeric monolith // *Analytical Chemistry.* – 2007.- V. 79(16). P. 6230-6235.
98. Belgrader P., Yuan B., Aflatooni N. Microfluidic differential extraction cartridge. WO/2005/028635. 31.03.2005.
99. Ugozzoli L. Purification and amplification of nucleic acids in a microfluidic device. US 20080003585A1. 03.01.2008.
100. Weigl B.H., Bardell R.L. DNA purification and analysis on nanoengineered surfaces. WO/2006/081324. 03.08.2006
101. Landers J.P., Ferrance J.P., Wen J., Guillo C. DNA purification in a multi-stage, multi-phase microchip. WO/2008/058204. 15.05.2008.
102. Partha Sarathy R.V., Ericson K.K., Bedingham W. Methods for nucleic acid isolation and kits using a microfluidic device and sedimenting reagent. WO/2005/068626. 28.07.2005.
103. Samper V., Hongmiao J.I., Chen Yu., Heng C.K., Lim T.M. Nucleic acid purification chip. WO/2005/066343. 21.07.2005.
104. Southgate P.D., Loewy Z.G. Automated nucleic acid isolation. WO/1997/047967. 18.12.1997.
105. Jovanovich S.B., Blaga I.I., Rank D. Microfluidic devices. WO/2008/030631. 13.03.2008.
106. Barlag H., Birkle S., Gumbrecht W., Kühn D., Paulika P., Stanzel M. Arrangement for integrated and automated DNA or protein analysis in a single-use cartridge,

- method for producing such a cartridge and operating method for DNA or protein analysis using such a cartridge. WO/2006/042838. 27.04.2006.
107. Battrell C.F., Weigl B.H., Shen M., Houkal J.M., Lankaster C.A., Braidford W. Method and system for microfluidic manipulation, amplification and analysis of fluids, for example, bacteria assays and antiglobulin testing. WO/2004/065010. 05.08.2004.
108. Chen Z., Mauk M.G., Wang J., Abrams W.R., Corstjens P.L., Niedbala R.S., Malamud D., Bau H. Development of a microfluidic device for detection of pathogens in oral samples using upconverting phosphor technology (UPT) // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 2007. - V.1098. P. 429-436.
109. Inoue H., Knight I.T., Dale G.A., Colwell R.R. Method and molecular diagnostic device for detection, analysis and identification of genomic DNA. WO/2007/028084. 08.03.2007.
110. Cady N.C., Batt C.A., Stelick S.J., Kunnavakkam M.V., Yang X. Real-time PCR detection of microorganisms using an integrated microfluidics platform. WO/2006/085948. 17.08.2006.
111. Liu R.H., Lodes M.J., Nguyen T., Siuda T., Slota M., Fuji H.S., McShea A. Validation of a fully integrated microfluidic array device for influenza A subtype identification and sequencing // *Anal. Chem.* – 2006. - V. 78(12). P. 4184-4193.
112. Liu R.H., Nguyen T., Schwarzkopf K., Fuji H.S., Petrova A., Siuda T., Peyvan K., Bizak M., Danley D., McShea A. Fully integrated miniature device for automated gene expression DNA microarray processing // *Anal. Chem.* – 2006. - V. 78(6). P.1980-1986.
113. Лисичкин Г.В., Фадеев А.Ю., Сердан А.А., Нестеренко П.Н., Миншалев П.Г., Фурман Д.Б. Под ред. Г.В. Лисичкина. Химия привитых поверхностных соединений. – 1986. - М.: «ФИЗМАТЛИТ», 592 с.
114. Berendsen G.E., Galan L.D. Geometrical model for chemically bonded TMS and PDS phases // *Journal of Liquid Chromatography.* – 1978. – V. 1(4). P. 403-426.
115. Berendsen G.E., Galan L.D. Preparation and chromatographic properties of some chemically bonded phases for reversed-phase liquid chromatography // *Journal of Liquid Chromatography.* – 1978. – V. 1(5). P. 561-586.
116. Айлер Р. Химия кремнезема. Пер. с англ. / Под ред. В.П. Прянишникова. – 1982. - М.: Мир. — 416 с. (1 том), 712 с. (2 том).
117. Киселев А.В., Лыгин В.И. Инфракрасные спектры поверхностных соединений и адсорбированных веществ. – 1972. - М.: Химия. – 459 с.

118. Unger K.K. Porous silica: its properties and use as support in column liquid chromatography. J. of Chromatography Library. V. 16. – 1979. – Amsterdam – Oxford – New York: Elsevier Scientific Publishing Company. – 336 p.
119. Неймарк И.Е. Синтетические минеральные адсорбенты и носители катализаторов. – 1982. – Киев: Наукова думка. – 216 с.
120. Карнаухов А.П. Адсорбция Текстура дисперсных и пористых материалов. – 1998. – Новосибирск: «Наука». Сиб. предприятие РАН. 470 с.
121. Berendsen G.E. Preparation and characterization of chemically bonded phases for HPLC. Doctoral Thesis. Delft University of Technology. Delft, The Netherlands, 1980.
122. Малыгин А.А. Технология молекулярного наслаивания и некоторые области ее применения // Журнал прикладной химии. - 1996. - Т. 69. № 10. С. 1585-1593.
123. Snyder L.R., Ward J.W. The Surface Structure of Porous Silica // J. Phys. Chem. – 1966. - 70 (12). P. 3941–3952.
124. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии (планарная хроматография). Т. 1. Пер. с англ. / Под ред. В.Г. Березкина. – 1988. – М.: не указано. - 407 с.
125. Motadel A. Multicapillary sample preparation devices and methods for processing analytes. US 2011/0092686 A1. 21.04.2011.
126. Скибина Ю.С. Исследование оптических свойств стеклянных микроструктурных волокон: дис. ... канд. физ.-мат. Наук. Саратов, 2003. 158 с.
127. Кестинг Р.Е. Синтетические полимерные мембраны. Структурный аспект. Пер. с англ. / Под ред. В.К. Ежова. – 1991. – М.: Химия. – 336 с.
128. Дытнерский Ю.И. Осмос и ультрафильтрация. – М.: Химия. – 1978, 352 с.
129. Акименко С.Н., Мамонова Т.И., Орелович О.Л., Маекава Я., Иошида М., Апель П.Ю. Свойства трековых мембран на основе полиэтиленнафталата // Мембраны. Серия: Критические технологии. - 2002, № 15. С. 21-28.
130. Абдуллин И.Ш., Ибрагимов Р.Г., Зайцева О.В., Парошин В.В. Современные методы изготовления композиционных мембран // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т. 16(9). С. 24-34.
131. Лепешин С.А. Микрофильтрационные полиамидные мембраны, обладающие стерилизующими и бактериостатическими свойствами: дис. ... канд. хим. наук. Владимир, 2016. 132 с.
132. Тимакова К.А., Федотов Ю.А., Лепешин С.А., Недачин А.Е., Прунтова О.В., Яворская Е.С., Панов Ю.Т. Модифицированные микрофильтрационные

- полиамидные мембраны с улучшенной сорбционной способностью // Перспективные материалы. - 2013. - №9. С. 37-42.
133. Панов Ю.Т., Тарасов А.В., Федотов Ю.А., Ильин М.И., Куликов И.М., Лепешин С.А., Ермолаева Е.В. Фазоинверсионный метод оценки анизотропии микрофльтрационных мембран // Фундаментальные исследования. - 2014. - №12(3). С. 500–504.
134. Сабуров В.В. Синтез композиционных перфторполимерсодержащих сорбентов и их использование в хроматографии биополимеров: дис. ... канд. хим. наук. М., 1989. 134 с.
135. Катаев А.Д. Синтез композиционных политрифторстиролсодержащих сорбентов и их использование в хроматографии биополимеров: дис. ... канд. хим. наук. М., 1993. 142 с.
136. Муйдинов М.Р. Синтез и исследование композиционных материалов, модифицированных поверхностно привитым политетрафторэтиленом: дис. ... докт. хим. наук. М., 2006. 376 с.
137. Капустин Д.В. Синтез композиционных сорбентов на основе фторированных полибутadiens для выделения нуклеиновых кислот: дис. ... канд. хим. наук. М., 2000. 134 с.
138. Ягудаева Е.Ю. Синтез полианилинсодержащих сорбентов для выделения и очистки нуклеиновых кислот и белков: дис. ... канд. хим. наук. М., 2003. 85 с.
139. Простякова А.И. Синтез полимерсодержащих сорбентов и их использование для односталийного выделения ДНК: дис. ... канд. хим. наук. М., 2013. 142 с.
140. Lee J.H., Kopecek J., Andrade J.D. Protein-resistant surfaces prepared by PEO-containing block copolymer surfactants // J. Biomed.Mat.Res. – 1989. - V. 23(3). P. 351-368.
141. Matsunaga T., Ikada Y. Dispersive component of surface free energy of hydrophilic polymers // J. Coll. Interface Sci. – 1981. - V. 84(1). P. 8-13.
142. Ikada Y., Suzuki M., Tamada Y. Polymer surfaces possessing minimal interaction with blood components. In: Shalaby Sh.W. (ed.) Polymers as Biomaterials. - 1984. - Plenum Press: NY, P. 135-147.
143. Absolom D.R., Zingg W., Newmann A.W. in: Brash J.L. (ed.) Proteins at Interfaces. ACS Symposium Series 343. – 1987. - American Chemical Society: Washington P. 401-421.
144. Nagaoka S., Mori Y., Takiuchi H., Yokota K., Tanzawa H., Nishiumi S., Shalaby Sh.W. Interaction between blood components and hydrogeles with Polyoxyethylene.

- In: In: Shalaby Sh.W. (ed.) *Polymers as Biomaterials*. - 1984. - Plenum Press: NY. P. 361-374.
145. Klein J., Luckham P. Forces between PEO layers, immersed in a good sorbent // *Nature*. – 1982. - V. 300. P. 429-431.
 146. Hesselink F.T. On the density distribution of segments of a terminally adsorbed macromolecule // *J. Phys. Chem.* – 1969. - V. 73(10). P. 3488-3490.
 147. Scheutjens J.M., Fler G.J. Statistical Theory of Adsorption of Interacting Chain Molecules // *J. Phys. Chem.* – 1979. - V. 83. P. 1619-1635.
 148. Scheutjens J.M., Fler G.J. Interaction between two adsorbed polymer layers // *Macromolecules*. – 1985. - V. 18. P. 1882-1900.
 149. Robb I.D., Smith R. The adsorption of copolymers of vinyl pyrrolidone on silica interface // *Polymer*. – 1997. - V. 18. P. 500-511.
 150. Kawaguchi M., Hagakawa M., Takahashi A. Adsorption of polystyrene onto silica at the theta temperature // *Polym. J.* – 1980. – V. 12. P. 265-270.
 151. Furusawa K., Yamamoto K. Competitive effects in polymer adsorption and exchangeability of adsorption layer // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1983. – V. 56. P. 1958-1962.
 152. Sakai H., Imamura Y. The configuration of adsorbed polymer at the solid-liquid interface as depicted by ESR and IR studies // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1980. - V. 53(6). P. 1749-1750.
 153. Van de Ven T.G.V. Kinetic aspects of polymer and polyelectrolyte adsorption on surfaces // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 1994. – V. 48. P. 121-140.
 154. Watkins H.M., Vallée-Bélisle A., Ricci F., Makarov D.E. Entropic and Electrostatic effects on the folding free energy of a surface-attached biomolecule: an experimental and theoretical study // *J. Am. Chem. Soc.* – 2012. – V. 134. P. 2120-2126.
 155. Netz R.R., Andelman D. Neutral and charged polymers at interfaces // *Physics Reports*. – 2003. - V. 380(1-2). P. 1-95.
 156. Douglas J.F. How does surface roughness affect polymer-surface interaction // *Macromolecules*. – 1989. – V. 22(9). P. 3707-3716.
 157. Hommel H., Legrand A.P., Tougne P., Balard H., Papirer E. Influence of the grafting ratio on the conformation of poly (ethylene oxide) chains grafted on silica // *Macromolecules*. – 1984. – V. 17(8). P. 1578-1581.
 158. Furusawa K., Yamamoto K. Competitive effects in polymer adsorption and exchangeability of adsorption layer // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1983. - V. 56(7). P. 1958-1962.

159. Pefferkorn E., Haouam A., Varoqui R. Kinetics of exchange between adsorbed and free polymer at the solid/liquid interface // *Macromolecules*. – 1989. - V. 22(6). P. 2677-2682.
160. Cosgrove T. Estimates of the bonded fractions of an adsorbed polymer at the solid-liquid interface // *Macromolecules*. – 1982. – V. 15(5). P. 1290-1293.
161. Hiatt C.W., Shelokov A., Rosental E.J., Galimore J.M. Treatment of controlled pore glass with poly(ethylene oxide) to prevent adsorption of viruses // *J. Chromatogr.* – 1971. - V. 56. P. 362-364.
162. Darling T., Albert J., Russel P., Albert D.M., Reid T.W. Rapid purification of an RNA tumor virus and proteins by high performance steric exclusion chromatography on porous glass columns // *J. Chromatogr.* – 1977. - V. 131. P. 383-390.
163. Letot L., Lescq J., Quivoron C. A new packing for aqueous size-exclusion chromatography. Polyvinylpyrrolidone-coated columns // *J. Liq. Chromatogr.* – 1981. – V. 4. P. 1311-1316.
164. Копьев В.П. Жигис Л.С., Решетов П.Д., Бабурина Т.М., Брылина В.И., Пантелеев Ю.В., Сурин В.Н. Фильтрационно-хроматографический метод очистки ротавирусов // *Вопр. Вирусологии*. – 1989. - Т. 34(6). С. 760.
165. Tardy M., Tayot J.L., Roumyantseff M., Plan R. Epton R. (ed.) *Chromatography of Synthetic and Biological Polymers*. V. 2. – 1978. - Ellis Horwood: Chichester. P. 231-236.
166. Santarelli X., Muller D., Jozefonvicz J. Dextran-coated silica packings for high-performance size-exclusion chromatography of proteins // *J. Chromatography*. – 1988. – V. 443. P. 55-62.
167. Букбарде В.У., Арен А.К., Грузинь И.В., Лестровая Н.Н., Лебедева Ж.Д., Волкова И.М., Рубан Е.Л. Способ получения сорбента для аффинной хроматографии микробных липаз. Авт. свид. СССР № 935121, 1980, опубликовано в Б.И. № 22, 1982.
168. Rosevear A., Mattock P. Improvements in or relating to affinity chromatography. US 1602432, 1981.
169. Alpert A., Regnier F.E. Preparation of porous microparticulate anion-exchange chromatography support for proteins // *J. Chromatogr.* – 1979. – V. 185. P. 375-392.
170. Lawson T.G., Regnier F.E., Weith H.L. Separation of synthetic oligonucleotides on column of microparticulate silica coated with crosslinked polyethylenimine // *Anal. Biochem.* – 1983. – V. 133(1). P. 85-93.

171. Watanabe K., Chow W.S., Royer G.P. Column chromatography on polyethylenimine-silica: rapid resolution of nucleotides and proteins with short columns and low pressure // *Anal. Biochem.* – 1982. – V. 127(1). P. 155-158.
172. Drager R.R., Regnier F.E. High-performance anion-exchange chromatography of oligonucleotides // *Anal. Biochem.* – 1985. - V. 145(1). P. 47-56.
173. Wilchek M. Stable and high-capacity Sepharose derivatives for affinity chromatography // *FEBS Lett.* – 1973. – V. 33(1). P. 70-72.
174. Kurganov A., Kuzmenko O., Davankov V.A., Eray B., Unger K.K., Trudinger U. Effect of polystyrene coating on pore structural and chromatographic properties of silica packings // *J. Chromatogr.* – 1990. – V. 506. P. 391-400.
175. Gupta S., Pfannkoch E., Regnier F.E. High-performance cation-exchange chromatography of proteins // *Anal. Biochem.* – 1983. – V. 128(1). P. 196-201.
176. Fausnaugh J.L., Pfannkoch E., Gupta S., Regnier F.E. High-performance hydrophobic interaction chromatography of proteins // *Anal. Biochem.* – 1984. – V. 137(2). P. 464-472.
177. Alpert A. Cation-exchange high-performance liquid chromatography of proteins on poly(aspartic acid)-silica // *J. Chromatogr.* – 1983. – V. 266. P. 23-37.
178. Miller N.T., Feibush B., Karger B.L. Wide-pore silica based ether-bonded phases for separation of proteins by high-performance hydrophobic-interaction and size-exclusion chromatography // *J. Chromatogr.* – 1985. – V. 316. P. 519-536.
179. Elrassi Z., Horvath C. Hydrophobic-interaction chromatography of t-RNA and proteins // *J. Liq. Chromatogr.* – 1986. – V. 9(15). P. 3245-3268.
180. Chang J.E., Elrassi Z., Horvath C. Silica-bound polyethyleneglycol as stationary phase for separation of proteins by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatogr.* – 1985. – V. 319(3). P. 396-399.
181. Papirer E., Nguyen V.T. Anionic grafting on silica // *J. Polym. Sci. Part B: Polymer Letters.* – 1972. – V. 10. P. 167-170.
182. Иванов А.Е., Верховская Л.В., Хилько С.Н., Зубов В.П. Твердокаркасные широкопористые сорбенты для гидрофобной хроматографии белков // *Биоорганич. хим.* – 1990. - Т. 16(8). С. 1028-1039.
183. Иванов А.Е., Жигис Л.С., Чеховских Е.Ю., Решетов П.Д., Зубов В.П. Хлорангидридсодержащие носители для иммобилизации биоспецифических лигандов // *Биоорганич. Химия.* – 1985. – Т. 11, № 11. С. 1527-1532.
184. Иванов А.Е., Жигис Л.С., Турчинский М.Ф., Копьев В.П., Решетов П.Д., Зубов В.П., Кастрикина Л.Н., Лонская Н.И. Полимерно-модифицированные сорбенты

- для молекулярно-ситовой хроматографии // Мол. Ген. Микробиол. Вирусол. – 1987. – Т. 11. С. 39-46.
185. Таубман А.Б. – В кн.: Материалы Пятого Всесоюзного симпозиума по механоэмиссии и механохимии твердых тел, Окт. 1975 г. [Текст] / АН СССР, Науч. совет по физ.-хим. механике и коллоидной химии Ин-та физ. химии, АН ЭССР, Отд-ние физ.-мат. и техн. наук, Респ. совет Эст. науч.-техн. о-ва и др. - Таллин : [б. и.], 1977. Т. 1. с. 79.
186. Berg D., Tiller H.J.G., Kopka J., Lanyguth B. Polymerization on activated SiO₂ surfaces – IR spectroscopic studies // Zeitschrift fur Chemie . – 1978. – V. 18(6). P. 219-220.
187. Иванчев С.С. Радиальная полимеризация. – 1985. – Л.: Химия. 280 с.
188. Брык М.Т. Полимеризация на твердой поверхности неорганических веществ. – 1981. - Киев: Наукова думка. 288 с.
189. Цетлин Б.Л., Власов А.В., Бабкин И.Ю. Радиационная прививочная полимеризация. В кн: Радиационная химия полимеров. – 1973. - М.: Наука. С. 108-185.
190. Брук М.А. Радиационная полимеризация мономеров, адсорбированных на поверхности твердых тел // Успехи химии - 1987. - Т. 56(1). С. 148-174.
191. Оленин А.В., Кристюк А.Л., Голубев В.Б., Зубов В.П., Кабанов В.А. Изучение механизма инициированной пострadiационной прививочной полимеризации виниловых мономеров на твердых неорганических материалах // Высокомогл. Соед. – 1983. - Т. 25А. С. 423-426.
192. Брук М.А., Абкин А.Д., Демидович В.В., Ерошина Л.В., Урман Я.Г., Слоним М.Я., Леденева Н.В. Исследование радиационной полимеризации тетрафторэтилена, адсорбированного на некоторых высокопористых сорбентах // Высокомогл. Соед. -1975. - Т. 17А. С. 3-12.
193. Rosevear A., Mattock P. Improvments in or relating to affinity chromatography. US Patent № 1602432, 1981.
194. Bleha M., Votavova E., Tlustakova M, Kalal J. Internal structure of porous glass coated with a polymer layer of poly(2,3-epoxypropylmetacrylate) // Angew. Makromol. Chem. – 1982. - V. 107. P. 25-32.
195. Varabas E.S., Grosser F. Insoluble crosslinked homopolymers and copolymers, polymerized on an inert substrate. US Patent No 3941718, 1976.

196. Коршак В.В., Зубакова Л.В., Качурина Н.В., Балашова О.В. Химическая прививка виниловых гетероциклических мономеров к поверхности минеральных носителей // *Высокомолекулярное Соединение*. – 1979. – Т. 21А. С. 1132-1138.
197. Hayakawa K., Kawase K., Yamakita H. Graft polymerization of triethoxyvinylsilane-styrene and triethoxyvinylsilane-methylmethacrylate binary monomers onto various silicates // *J. Appl. Polym. Sci.* – 1977. – V. 21(11). P. 2921-2932.
198. Мчедлишвили Б.В., Смирнов А.В., Миртвухина О.Н., Молодкина Л.М., Макарова С.В., Коликов В.М., Вензель Б.И., Петухов В.В., Молодкин В.М. Структура, адсорбционные и хроматографические свойства макропористых стекол, модифицированных полимеризацией N-винилпирролидона // *Коллоидный Журнал*. – 1984. - Т. 46(1). С. 132-136.
199. Abuelafiya R., Pesek J. Synthesis of chemically bonded polystyrene-divinylbenzene on silica by free radical initiation with gamma-radiation cross-linking // *J. Liq. Chrom.* – 1989. – V. 12(9). P. 1571-1578.
200. Schutijser J. Porous inorganic support material coated with an organic phase for use in chromatography and process for its preparation. US Patent № 4415631, 1983.
201. Müller W. New phase supports for partition chromatography of biopolymers // *Biolog. Chem. Hoppe-Seyler*. – 1987. – V. 368(7). P. 763.
202. Rogers M.E., Adlard M.W., Sannders G., Holt G. High-performance liquid affinity chromatography of β -lactamase // *J. Chromatogr.* – 1985. – V. 326. P. 163-172.
203. Kosaka Y., Yemura M., Hashimoto T., Fukano K. High-energy radiation induced polymerization on a chromatographic solid supports. US Patent № 4045353, 1977.
204. Варламов В.П., Власов А.В., Банникова Т.Е., Цетлин Б.Л., Рогожин С.В. Способ получения водонерастворимых биологически активных соединений. Авт. свид. СССР № 689200, 1980, опубликовано в Б.И. № 38, 1980.
205. Lenfeld J., Kalal J., Tlust'akova M. Reactive polymers. XLI. Preparation of poly(2,3-эпохупропилметакрилат) on silica gel // *Acta Polymerica*. – 1981. – V. 32 (12). P. 753-757.
206. Липатов Ю.С., Сергеева Л.М. Адсорбция полимеров. – 1972. - Киев: Наукова Думка. 196 с.
207. Г.В. Лисичкин, А.Ю. Фадеев, А.А. Сердан, П.Н. Нестеренко, П.Г. Мингалев, Д.Б. Фурман. Химия привитых поверхностных соединений / Под ред. Г.В. Лисичкина. – М.: ФИЗМАТЛИТ, 2003. 592 с.

208. Тертых Б.А., Белякова Л.А. Химически реакции с участием поверхности кремнезема. – 1991. - Киев: Наукова думка. 264 с.
209. Ho K.Y., McKay G., Yeung K.L. Selective adsorbents from ordered mesoporous silica // *Langmuir*. – 2003. – V. 19(7). P. 3019–3024.
210. Erdem A., Shahwanb T., Çağır A., Eroğlu A.E. Synthesis of aminopropyl triethoxysilane-functionalized silica and its application in speciation studies of vanadium (IV) and vanadium (V) // *Chemical Engineering Journal*. – 2011. - V. 174(1). P. 76–85.
211. Ворошилова О.И., Кисилев А.В., Никитин Ю.С. Синтез и исследование кремнеземных носителей с поверхностью, модифицированной γ -аминопропильными группами // *Коллоидн. журнал*. – 1980. - Т. 42(2). С. 223-229.
212. Huth J., Danielson N. Derivatization of KEL-F particles with normal-butyllithium for liquid-chromatography // *Analytical chemistry*. - V. 54(6). P. 930-934.
213. Danielson N.D., Ahmed S., Huth J.A., Targrove M.A. Characterization of Organomagnesium Modified Kel-F Polymers as Column Packings // *J. Liquid Chromatogr.* – 1986. – V. 9(4). P. 727-735.
214. Siergiej R.W., Danielson N.D. Preparation and characterization of Kel-F Ion-Exchange HPLC Packings // *J. Chromatogr. Sci.* - 1983. - V. 21(8). P. 362-366.
215. Kruepelman M., Danielson N.D. Liquid chromatographic characterization of picolyl Kel-F as a reverse phase, weak anion-exchange column packing // *Anal. Chem.* – 1985. – V. 57(1). P. 340-346.
216. Pearson R.L., Weiss J.F., Kelmers A.D. Improvement separation of transfer RNA's on polychlorotrifluoroethylene-supported reversed phase chromatography columns. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1971. - V. 228(3). P. 770-774.
217. Egan B.Z. Separation of oligonucleotides by reversed-phase chromatography // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – V. 299(2). P. 245-252.
218. Singhal R.P. Anion-exchange chromatography on reversed-phase columns: isolation of nucleosides, nucleotides and oligonucleotides from nucleic acids from cytoplasm // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1973. – V. 319(1). P. 11-24.
219. Berendsen G.E., Pikaart K.A., de Galan L., Olieman C. (Heptafluorodecyl)dimethylsilyl bonded phase for reversed-phase liquid chromatography // *Anal. Chem.* – 1980. – V. 52(12). P. 1990-1993.

220. Billiet H.A.H., De Galan L. Retention and selectivity characteristics of a non-polar perfluorinated stationary phase for liquid chromatography // *J. Chrom. A.* – 1981. – V. 218. P. 443-454.
221. Ecking W., Trung B., Radeaglia R., Gross U. Group Separation of alkyl-substituted aromatic hydrocarbons by high-performance liquid chromatography using perfluorocarbon modified silica gel // *Chromatographia.* – 1982. – V. 16(1). P. 178-182.
222. Csato E., Fulop N., Szabo G. Preparation and comparison of a pentafluorophenyl stationary phase for reversed-phase liquid chromatography // *J. Chromatogr.* – 1990. – V. 551. P. 79-88.
223. Kobos R.K., Eveleigh J.W., Arentzen R. A novel fluorocarbon-based immobilization technology // *Trends in biotechnology.* – 1989. – V. 7(4). P. 101-105.
224. Xindu G., Carr P.W. Use of fluorinated bonded phases in reversed-phase high-performance liquid chromatography of proteins // *J. Chromatogr.* – 1983. – V. 269(2). P. 96-102.
225. Williams D.E., Kabra P.M. Extended life for blood-serum analysis columns using dual zone chromatographic materials // *Anal. Chem.* – 1990. – V. 62(8). P. 807-810.
226. Pinkerton T.C. High-performance liquid-chromatography packing materials for the analysis of small molecules in biological matrices by direct injection // *J. Chromatography.* – 1991. - V. 544(1-2). P. 13-23.
227. Сабуров В.В., Муйдинов М.Р., Гурьянов С.А., Катаев А.Д., Туркин С.И., Зубов В.П. Перфторполимерсодержащие кремнеземные сорбенты и их применение в обращенно-фазовой хроматографии биологически-активных веществ // *Ж. физ. хим.* – 1991. – Т. 65(10). С. 2692-2698.
228. Муйдинов М.Р. Озониды перфторолефинов - новый класс инициаторов полимеризации // *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева).* – 2002. – Т. XLVI, № 3. С. 72-74.
229. Муйдинов М.Р. Разработка методов синтеза поверхностно модифицированных фторполимерсодержащих композиционных материалов // *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева).* – 2008. – Т. LI, № 3. С. 81-89.
230. Муйдинов М.Р., Сабуров В.В., Туркин С.И., Зубов В.П., Баркалов И.М., Овчинников Ю.А., Гольданский В.И. Способ получения модифицированного кремнеземного сорбента. А. с. 1839325 СССР. 1995.
231. Муйдинов М.Р. Способ получения перфторполимерсодержащего минерального гемосорбента. Патент РФ 2104695. 1998.

232. Муйдинов М.Р., Ивлев В.А., Бойков П.Я. Колонк для сорбции биологических жидкостей. Патент РФ 2106155. 1998.
233. Муйдинов М.Р. Способ получения перфторполимерсодержащего углеродного гемосорбента. Патент РФ 2118898. 1998.
234. Hjerten S. Fractionation of proteins on sepharose at low pH and on polytetrafluoroethylene // *Journal of Chromatography A.* – 1978. - V. 159. P. 47-55.
235. Hjerten S., Hellman U. Chromatographic desalting, deproteinization and concentration of nucleic acids on columns of polytetrafluoroethylene // *Journal of Chromatography A.* – 1980. - V. 202(3). P. 391-395.
236. Ivanov A.E., Saburov V.V., Zubov V.V. Polymer-coated adsorbents for separation of biopolymers // *Adv. Polym. Sci.* - 1992. - V. 104. P. 135–175.
237. Gorham W.F. A New, General Synthetic Method for the Preparation of Linear Poly-*p*-xylylenes // *Journal of Polymer Science Part A-1: Polymer Chemistry.* - 1966. - V. 4(12). P. 3027–3039.
238. Кардаш И.Е., Пибалк А.В., Праведников А.Н. Химия и применение поли-*n*-ксилиленов // *Химия и технолоия высокомолекулярных соединений.* - 1984. - Т. 19. - С. 66.
239. Park S.Y., Blackwell J., Chvalun S.N., Mailyan K.A., Pebalk A.V., Kardash I.E. A three-dimensionally oriented texture for poly(alpha,alpha,alpha',alpha'-tetrafluoro-*p*-xylylene) // *Macromolecules.* – 1999. – V. 32(23). P. 7845.
240. Штильман, М.И. Полимеры медико-биологического назначения / М.И. Штильман. – 2006. - М.: ИКЦ «Академкнига». 400 с.
241. Strel'tsov D.R., Grigor'ev E.I., Dmitryakov P.I., Mailyan K.A., Pebalk A.V., Chvalun S.N., Erina N.A. Initial stages of growth of poly(*p*-xylylene) coatings: AFM study. *Polymer Science, Series A.* 2009. V. 51(8). P. 881-890.
242. Brancato L., Keulemans G., Gijzenbergh P., Puers R. Plasma enhanced hydrophobicity of parylene-C surfaces for a blood contacting pressure sensor. 28th European Conference on Solid-State Transducers (EUROSENSORS 2014). In: *Procedia Engineering.* -2014. - V. 87. P. 336-339.
243. Wright D., Rajalingam B., Karp J.M., Selvarasah S., Ling Y., Yeh J., Langer R., Dokmeci M.R., Khademhosseini A. Reusable, reversibly sealable parylene membranes for cell and protein patterning // *J. Biomed. Mater. Res. A.* - 2008. - V. 85(2), P. 530-538.
244. Блайт Э.Р., Блур Д. Электрические свойства полимеров // М.: Физматлит. – 2008. – 375 с.

245. Kotz R., Carlen M. Principles and applications of electrochemical capacitors // *Electrochem. Acta.* – 2000. – V. 45(15-16). P. 2483-2498.
246. Shulga Y.M, Baskakov S.A., Smirnov V.A., Shulga N.Y., Belay K.G., Gutsev G.L. Graphene oxide films as separators of polyaniline-based supercapacitors // *J. Power Sources.* - 2014. - V. 245. - P. 33-36.
247. Пинус И.Ю., Ярославцев А.Б., Насибулин Е.Н., Сергеев В.Г., Кабанов В.А. Композиционный твердый электролит на основе гидрофосфата циркония и полианилина // *Журнал Неорганической Химии.* - 2006. - Т. 51. С. 1035-1048.
248. Stolarczyk A., Ельяшевич Г.К., Розова Е.Ю., Lapkowski M. Высокомолекул. Соед. // 2005. – Т. 47(3). С. 524-530.
249. Пулялина А.Ю., Полоцкая Г.А., Калюжная Л.М., Сапрыкина Н.Н., Сущенко И.Г., Мелешко Т.К., Тойка А.М. Исследование сорбционных и транспортных свойств мембран, содержащих полианилин // *Высокомолекулярные соединения, Серия А.* - 2010. – Т. 52(8). С. 1466-1473.
250. Trivedi D.C. Polyanilines. Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers / Nalwa H.S. (ed.). – 1997. – Wiley: Chichester. - V. 2. P. 505-572.
251. Ким В.-К., Хонг Ю.Д., Меньшикова И.П., Боева Ж.А., Пышкина О.А., Сергеев В.Г., Хохлов А.Р., Ли М.Ч., Годовский Д.Ю. Слабоотражающее антистатическое твердое покрытие на основе акрилатов и полианилина, а также способ его получения. RU 2010 107 926 А. 20.09.2011.
252. Kazantseva N.E. Magnetic particle-filled polymer microcomposites. In: Sabu T. (ed.) *Polymer Composites.* – 2012. – Willey-VCH:Weinheim. - V. 1. P. 613-669.
253. Wessling B. Dispersion as the link between basic research and commercial applications of conductive polymers (polyaniline) // *Synt. Met.* - 1998. - V. 93(2). P. 143–154.
254. Андреев В.Н. Эффект фталиевой и салициловой кислот на синтез и свойства пленок полианилина // *Электрохимия.* - 2000. - Т. 36(3). - С.379-383.
255. Подловченко Б.И., Андреев В.Н. Электрокатализ на модифицированных полимерами электродах // *Успехи Химии.* - 2002. - Т. 71(10). - С. 950-966.
256. Ярмоленко О.В., Хатмуллина К.Г., Курмаз С.В., Грачев В.П., Ефимов О.Н., Гусев А.Л. Исследование электрохимических свойств электрохромной системы полианилин/гель-электролит на основе сшитого сверхразветвленного полимера // *Международный научный журнал Альтернативная энергетика и экология (ISJAEE).* – 2013. - Т. 13, № 14(136). С. 76-82.

257. Чеберяко К.В. Структура тонких слоев полианилина для электрохромных и электролюминесцентных устройств отображения информации: Дис. ... канд. хим. наук. М., 2003. 140 с.
258. Фазуллин Д.Д., Мачтакова А.И., Маврин Г.В., Шайхиев И.Г. Доочистка гальванических сточных вод ионообменной мембраной из ацетата целлюлозы с поверхностным слоем из полианилина // Вестн. технол. ун-та. - 2016. - Т. 19(14). - С. 172-174.
259. Крылов А.А., Рясенский С.С. Электрохимический отклик полианилинового актуатора, допированного различными неорганическими анионами // Вестник ТвГУ. Серия: Химия. - 2017. - № 4. С. 130–134.
260. Скупов Александр (отчество не указано). Проводящие покрытия для электронной литографии на диэлектрических подложках // ВЕКТОР высоких технологий. – 2017. - №2 (31). С. 14-17.
261. Власов Ю.Г., Легин А.В. Химические сенсоры на пороге XXI века: от единичных «селективных» сенсоров до систем неспецифичных (неселективных) сенсоров («электронный нос», «электронный язык»). В кн.: Академик Б.П. Никольский. Жизнь. Труды. Школа. / Под ред. А.А. Белюстина и Ф.А. Белинской. – 2000. – СПб: Изд-во С.-Петербур. ун-та. 296 с. С. 267-280.
262. Власов Ю.Г., Легин А.В., Рудницкая А.М. Электронный язык - системы химических сенсоров для анализа водных сред // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). - 2008. – Т. LII, № 2. С. 101-112.
263. Сапурина И.Ю. Наноструктурированный полианилин и композиционные материалы на его основе: дис. ... докт. хим. наук. С. _Петербург, 2015. 292 с.
264. Arslan F., Ustabaş S., Arslan H. An Amperometric Biosensor for Glucose Determination Prepared from Glucose Oxidase Immobilized in Polyaniline-Polyvinylsulfonate Film // Sensors. – 2011. – V. 11(8). P. 8152- 8163.
265. Rivers T.J., Hudson T.W., Schmidt C.E. Synthesis of a novel, biodegradable electrically conducting polymer for biomedical applications // Adv. Func. Mater. - 2002. - V. 12(1). - P. 33-37.
266. Otero T.F., Martinez J.G., Arias-Pardilla J. Biomimetic electrochemistry from conducting polymers. A review Artificial muscles, smart membranes, smart drug delivery and computer/neuron interfaces // Electrochimica Acta - 2012. - V. 84(SI). P. 112- 128.
267. Иванова В.Т., Иванов В.Ф., Грибкова О.Л., Курочкина Я.Е., Матюшина Р.О., Ванников А.В. Полианилин в качестве сорбентов для удаления вирусов, белков

- невирусной природы и в качестве основы иммуносорбентов, способ удаления или фиксации вирусов с помощью этих сорбентов, способ иммуносорбции с помощью этих сорбентов, способ сорбции с помощью этих сорбентов. RU 2 372 951 C2. 20.11.2009.
268. Морозова Е.О. Сорбционное взаимодействие микропатогенов с полимерными материалами на основе полипиррола: дис. ... канд. биол. наук. Москва, 2018. 142 с.
269. Runge F.F. Ueber einige Produkte der Steinkohlendestillation // Poggendorf's Annalen der Physik und Chemie. - 1834. - V. 31. P. 513-524.
270. Fritzsche J. Ueber das Anilin, ein neues Zersetzungsproduct des Indigo // Bull. Sci. Acad. Imp. Sci. Saint-Petersbourg. - 1840. - V. VII(12). P. 161.
271. Осадченко С.В. Стабилизированные дисперсии полианилина в водных растворах поли(N-винилпирролидона): дис. ... канд. хим. наук. Москва, 2013. 121 с.
272. Green A.G., Woodhead A.E. Aniline-black and allied compounds. Part I // J. Chem. Soc. - 1910. - V. 97. P. 2388.
273. Pohl H.A., Engelhardt E.H. Synthesis and characterization of some highly conjugated semiconducting polymers // J. Phys. Chem. - 1962. - V 66(11). P. 2085-2095.
274. De Surville R., Jozefowicz M., Yu L.T., Pepichon J., Buvet R. Electrochemical chains using photolytic organic semiconductors // Electrochimica Acta. - 1968. - V. 13(6). P. 1451-1458.
275. Heeger A.J. Semiconducting and metallic polymers: The fourth generation of polymeric materials (Nobel lecture) // Angew. Chem. Int. Ed. - 2001. - Vol. 40(14). P. 2591-2611.
276. Toshima N., Yan H., Ishiwatare M. Catalytic polymerization of aniline and its derivatives by using copper (II) salts and oxygen. New type of polyaniline with branched structure. Bulletin of the Chemical Society of Japan. - 1994. - V. 67(7). P.1947-1953.
277. Wolf J.F., Forbes C.E., Gould S. Shacklette L.W. Proton-dependent electrochemical behavior of oligomeric polyaniline compounds // J. of the Electrochemical Society. - 1989. - V. 136(10). P. 2887-2891.
278. Кобрянский В.М., Арнаутов С.А., Мотякин М.В. Изучение механизма реакции конденсации анилина на примере получения водорастворимого полимера. Высокомолекулярные соединения, Серия А. - 1995. - Т. 37(1). С. 35-38.

279. Lux F. Properties of electronically conductive polyaniline - a comparison between well-known literature data and some recent experimental findings // *Polymer*. – 1994. – V. 35(14). P. 2915–2936.
280. Neoh K.G., Kang E.T., Tan K.L. Protonation of leucoemeraldine in the solid state and in solution // *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* – 1993. – V. 31(4). P. 395–401.
281. Sapurina I., Shishov M. Oxidative polymerization of aniline: Polyaniline molecular synthesis and the formation of supramolecular structures // *New polymers for special applications* / A.S. Gomes (ed.) - 2012. - Croatia: INTECH. - 2012. - V. 9. - P. 251-312.
282. Омельченко О.Д. Полимеризация анилина в присутствии полимерных сульфокислот: влияние конформации поликислоты на свойства комплексов полианилина: дис. ... канд. хим. наук. Москва, 2014. 156 с.
283. O'Connell P.J., Gormally C., Pravda M., Guilbault G.G. Development of an amperometric L-ascorbic acid (Vitamin C) sensor based on electropolymerised aniline for pharmaceutical and food analysis // *Anal. Chim. Acta.* – 2001. – V. 431(2). P. 239–247.
284. Xavier M.G., Venancio E.C., Pereira E.C., Leite F.L., Leite E.R., MacDiarmid A.G., Mattoso L.H.C. Synthesis of nanoparticles and nanofibers of polyaniline by potentiodynamic electrochemical polymerization // *J. Nanosci. Nanotechnol.* – 2009. – V. 9(3). P. 2169–2172.
285. Милакин К.А. Структура и свойства полианилина, полученного в присутствии углеродных матриц: дис. ... канд. хим. наук. Москва, 2015. 142 с.
286. Wei Y., Sun Y., Tang X. Auto-acceleration and kinetics of electrochemical polymerization of aniline // *J. Phys. Chem.* – 1989. – V. 93(12). P. 4878-4881.
287. Odian G. Principles of polymerization, 4th ed. / John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey. – 2004. – 812 p.
288. Mohilner D.M., Adams R.N., Argersinger W.J. Investigation of kinetics and mechanism of anodic oxidation of aniline in aqueous sulfuric acid solutions at a platinum electrode // *J. Electrochem Soc.* - 1962 - V. 84. P. 3618–3625.
289. Genies E.M., Tsintavis C. Redox mechanism and electrochemical-behavior of polyaniline deposits // *J. Electroanal. Chem.* - 1985. - V. 195. P. 109–128.
290. Genies E.M., Penneau J.F., Lapkowski M. Polyanilines from electropolymerization of azobenzene // *J. of Electroanal. Chem. & Inetfacial Electrochem.* - 1989. - V. 260(1). - P.145–156.

291. Heichert C., Hartmann H. On the Formation of Mauvein: Mechanistic Considerations and Preparative Results // *Z. Naturforsch. B–A, J. Chem. Sci.* 2009 – V. 64(6). P. 747–755.
292. Beadle P.M., Nicolau Y.F., Banka E., Rannou P., Djurado D. Controlled polymerization of aniline at sub-zero temperatures // *Synth. Met.* - 1998. - V. 95(1). P. 29-45.
293. Иванов В.Ф., Грибкова О.Л., Чеберяко К.В., Некрасов А.А., Тверской В.А., Ванников А.В. Матричный синтез полианилина в присутствии поли-2(акриламидо-2-метил-1-пропан)-сульфоновой кислоты // *Электрохимия.* - 2004. - Т. 40(3). С. 339–345.
294. Ivanov V.F., Gribkova O.L., Nekrasov A.A., Vannikov A.V., Meshkov G.B., Yaminsky I.V. Multilevel redox heterogeneity in polyaniline films: from molecular to macroscopic scale // *Mater. Sci. Eng. C.* - 2003. - V. 23(6-8). P. 953–957.
295. Ivanov V.F., Gribkova O.L., Novikov S.V., Nekrasov A. A., Isakova A.A., Vannikov A.V., Meshkov G.B., Yaminsky I.V. Redox heterogeneity in polyaniline films: from molecular to macroscopic scale // *Synth. Met.* - 2005. - V. 152(1-3). P. 153-156.
296. Sapurina I., Stejskal J. Review. The mechanism of the oxidative polymerization of aniline and the formation of supramolecular polyaniline structures // *Polymer International.* - 2008. - V. 57. P. 1295–1325.
297. Sapurina I., Tenkovtsev A.V., Stejskal J. Conjugated polyaniline as a result of the benzidine rearrangement // *Polymer International.* - 2015. - V. 64. P. 453–465.
298. Wei Y. Nonclassical or Reactivation Chain Polymerization: A General Scheme of polymerization // *J. Chem. Educ.* – 2001. – V. 78(4). P. 551.
299. do Nascimento G.M., Constantino V.R.L., Landers R., Temperini M.L.A. Aniline polymerization into montmorillonite clay: A spectroscopic investigation of the intercalated conduct-ling polymer // *Macromolecules.* - 2004. -V. 37(25). P. 9373-9385.
300. Liu X.X., Zhang L., Li Y.-B., Bian L.-J., Huo Y.-Q., Su Z. Electrosynthesis of Polyaniline/SiO₂ composite at high pH in the absence of extra supporting electrolyte // *Polym. Bull.* - 2006. - 57(6). P. 825-832.
301. Genies E.M., Lapkowski M., Penneau J.F. Cyclic voltammetry of polyaniline - interpretation of the middle peak // *J. Electroanal. Chem.* – 1988. – V. 249(1-2). P.97-107.

302. Trchova M., Sedenkova I., Konyushenko E.N., Stejskal J. Holler P., Ciric-Marjanovich G. Evolution of polyaniline nanotubes: The oxidation of aniline in water // *Journal of Physical Chemistry B.* – 2006. – V. 110(19). P. 9461-9468.
303. Bhadra S., Khastgir D., Singha N.K., Lee J.H. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline // *Progress in Polymer Science.* - 2009. - V. 34(8). P. 783-810.
304. Li D., Huang J., Kaner R.B. Polyaniline Nanofibers: A Unique Polymer Nanostructure for Versatile Applications // *Accounts of Chemical Research.* - 2009. - V. 42(1). P. 135-145.
305. Ciric-Marjanovic G. Recent advances in polyaniline research: Polymerization mechanisms, structural aspects, properties and applications // *Synthetic Metals.* - 2013. - V. 177. P. 1-47.
306. Wu J., Tang Q., Lin J. Self-assembly growth of oriented polyaniline arrays: A morphology and structure study // *Polymer.* - 2008. - V. 49(24). P. 5262-5266.
307. Zhou C., Han J., Song G., Guo R. Polyaniline hierarchical structures synthesized in aqueous solution: Micromats of nanofibers // *Macromolecules.* - 2007. - V. 40(20). P. 7075-7078.
308. Wang X., Liu N., Yan X., Zhang W., Wei Y. Alkali-guided synthesis of polyaniline hollow microspheres // *Chem. Lett.* - 2005. - V. 34(1). P. 42-43.
309. Kuroda-Sowa T., Munakata M., Matsuda H., Akiyama S., Maekawa M. Synthesis, structures and properties of copper(1) coordination polymers with bridging phenazine-construction of one-dimensional and 2-dimensional structures with pi-pi stacking of phenazine // *J. Chem. Soc. - Dalton Trans.* - 1995. - V. 13. P. 2201-2205.
310. Riede A., Helmstedt M., Sapurina I., Stejskal J. In-situ polymerized polyaniline films. 4. Film formation in dispersion polymerization of aniline // *J. Colloid and Interface Science.* - 2002. - V. 248(2). P. 413-418.
311. Stejskal J., Sapurina I. Polyaniline - a conducting polymer / Schubert U., Hüsing N., Laine R. (Eds.) *Materials Syntheses, A Practical Guide.* - 2008. - Springer-Verlag: Wien. P. 199-204.
312. Trchova M., Sapurina I., Prokes J., Stejskal J. FTIR spectroscopy of Ordered Polyaniline Films // *Synth. Met.* - 2003. - V. 135(1-3). P. 305-306.
313. Stejskal J., Trchova M. Aniline oligomers versus polyaniline // *Polym. Int.* - 2012. - V. 61(2). P. 240-251.

314. Ruckenstein E., Sun Y. Polyaniline-containing electrical conductive composite prepared by two inverted emulsion pathways // *Synthetic Metals*. – 1995. – V. 74(2). P. 107-113.
315. Zhu C., Wang C., Yang L., Bai C., Wang F. Dopant dimension influence on polyaniline film structure // *Applied Physics, A*. - 1999 – V. 68(4). P. 435-4738.
316. Gregory R.V., Kimbrell W.C., Kuhn H.H. Conductive textiles // *Synth. Met.* - 1989. - V. 28(1-2). P. 823-835.
317. Megha R., Ravikiran Y.T., Chethan B., Raj Prakash H.J., Vijaya Kumari S.C., Thomas S. Effect of mechanical mixing method of preparation of polyaniline-transition metal oxide composites on DC conductivity and humidity sensing response // *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. – 2018. – V. 29(9). P. 7253–7261.
318. Tzou K., Gregory R.V. Kinetic study of the chemical polymerization of aniline in aqueous solutions // *Synth. Met.* - 1992. - V. 47(3). P. 267-277.
319. Trivedi D.C., Dhawan S.K. Grafting of electronically conducting polyaniline on insulating surfaces // *Journal of Materials Chemistry*. - 1992. V. 2(10). P. 1091-1096.
320. Nicolau Y.F., Ermolieff A. XPS characterization of polyaniline filled n(+)-type porous silicon // *Synth. Met.* 1995. V. 71(1-3). P. 2073-2074.
321. А. В. Орлов, С. Г. Киселева, О. Ю. Юрченко, Г.П. Карпачева. Особенности окислительной полимеризации анилина в присутствии дополнительно внесенного субстрата // *Высокомолек. соед. А*, 2000, Т.42, № 12, с. 2089-2096
322. Киселева С.Г. Полимеризация анилина в гетерофазной системе: дис. ... канд. хим. наук. Москва, 2003. 158 с.
323. Гусева М.А., Исакова А.А., Грибкова О.Л., Тверской В.А., Иванов В.Ф., Ванников А.В., Федотов Ю.А. Матричная полимеризация анилина в присутствии полиамидов, содержащих сульфокислотные группы // *Высокомолекулярные соединения, Серия А*. – 2007. – Т. 49(1). С. 9-17.
324. Kabanov V.A., Aliev K.V., Kargina O.V., Patrikeeva T.I., Kargin V.A. Specific polymerization of vinylpyridinium salts. Polymerization on macromolecular “matrices” // *J. Polym. Sci., Part C*. - 1967. - V. 16(2). P. 1079-1094.
325. Кабанов В.А., Паписов И.М. Комплексобразование между комплементарными синтетическими полимерами и олигомерами в разбавленных растворах // *Высокомолек. соед. А*. - 1979. - Т. 21(2). С. 243-281.

326. Кабанов В.А., Каргина О.В., Ульянова М.В. Роль адсорбции мономера матрицей в реакции матричной полимеризации 4-винилпиридина на поликислотах // *Высокомолек. соед.* - 1980. - Т. (А) XXII(5). С. 1038-1044.
327. Харенко О.А., Харенко А.В., Касаикин В.А., Зезин А.Б., Кабанов В.А. Строение нестехиометричных водорастворимых полиэлектролитных комплексов // *Высокомолек. соед.* - 1979. - Т. (А) XXI(12). С. 2726-2733.
328. Kabanov V.A., Zezin A.B. Soluble interpolymeric complexes as a new class of polyelectrolytes // *Pure and Applied Chemistry.* - 1984. - V. 56 (3). P. 343 - 354.
329. Kabanov V.A. Inetrpolymer complexes as new materials for biomedical applications // *Makromolekulare Chemie – Macromolecular Simposia.* - 1991. - V. 48-49. P. 425 - 426.
330. Паписов И.М. Матричная полимеризация и другие матричные и псевдоматричные процессы как путь получения композиционных материалов // *Высокомолек. соед., Серия Б.* - 1997. - Т. 39(3). С. 562-574.
331. Sun L.F., Liu H.B., Clark R., Yang S.C. Double-strand polyaniline // *Synthetic Metals.* - 1997. - V. 84 (1-3). P. 67-68.
332. Liu W., Anagnostopoulos A., Bruno F.F., Senecal K., Kumar J., Tripathy S., Samuelson L. Biologically derived water soluble conducting polyaniline // *Synthetic Metals.* - 1999. - V. 101. P. 738-741.
333. Caramyshev A.V., Evtushenko E.G., Ivanov V.F., Barcel A.R., Roig M.G., Shnyrov V.L., van Huystee R.B., Kurochkin I.N., Vorobiev A.K., Sakharov I.Y. Synthesis of conducting polyelectrolyte complexes of polyaniline and poly(2-acrylamido-3-methyl-1-propanesulfonic acid) catalized by pH-stable palm tree peroxidase // *Biomacromolecules.* - 2005. - V. 6(3). - P. 1360-1366.
334. Кирш Ю.Э., Федотов Ю.А., Иудина Н.Н., Каталевский Е.Е. О конформационном состоянии макромолекул сульфосодержащих ароматических полиамидов на основе изо- и тетрафталевоы кислот в водном растворе // *Высокомолек. соед.: Сер.Б.-1990.-Т.32(6)* . С.403-404.
335. Кирш Ю.Э., Федотов Ю.А., Иудина Н.И., Артемов Д.Ю., Януль Н.А. // О полиэлектролитных свойствах сульфосодержащих полиамидов на основе изо- и терефталевоы кислот в водном растворе. // *Высокомолекулярные соединения.* - 1991. - Т. 33А(5). С.1127-1133.
336. Nikitin P.I., Gorshkov B.G., Nikitin E.P., Ksenevich T.I. Picoscope, a new label-free biosensor // *Sensors Actuators B.* - 2005. - V. 111-112. P. 500-504.

337. Дирюгина Е.Г., Буренин А.Г., Никитин М.П., Орлов А.В., Никитин П.И. Детекция в реальном времени аутоантител в сыворотке крови с помощью безметочной биосенсорной системы Пикоскоп® // ТРУДЫ МФТИ. - 2012. – Т. 4(3). С. 11-17.
338. Льяо Д.-Дж., Зыбин Д.И., Простякова А.И., Ягудаева Е.Ю., Вихров А.А., Ищенко А.А., Зубов В.П., Капустин Д.В. 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.
339. Yagudaeva E.Yu., Liaw D.-J., Ischenko A.A., Bagratashvili V.N., Zubov V.P., Prostyakova A.I., Ryazantsev D.Yu., Sviridov A.P., Kapustin D.V. New polyamide-containing sorbents for one-step isolation of DNA // J. Mater. Sci. – 2014. – V. 49. P. 3491-3496.
340. Liedberg B., Nylander C. Lundstrom I. Biosensing with surface-plasmon resonance – how it all started // Biosens. Bioelectron. - 1995. - V. 10(8). P. 1-9.
341. Skopinskaya S.N., Yarkov S.P., Zlobin V.N., Valiev H.H. The use of hydrosol hexacianferrate (II) ferrum (III) for developing diagnostic lateral flow tests // Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk. - 2012. - V. 3. P. 80-85.
342. Posthuma-Trumpie G.A., Korf J., Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey // Anal.-Bioanal. Chem. – 2009. – V. 393. P. 569–582.
343. Orlov A.V., Burenin A.G., Shipunova V.O., Lizunova A.A., Gorshkov B.G., Nikitin P.I. Development of immunoassays using interferometric real-time registration of their kinetics // Acta Naturae. – 2014. - V.6 № 1 (20). P. 85-95.
344. Yagudaeva E.Yu., Zybin D.I., Vikhrov A.A., Prostyakova A.I., Ischenko A.A., Zubov V.P., Kapustin D.V. 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.
345. Демин А.А., Чернова И.А., Шатаева Л.К. Ионообменная сорбция биологически-активных веществ / 2008. - С.-Петербург: Издательский дом С.-Петербургского университета. 154 с. (С. 69).
346. Teasdale P.R. Characterization of the chemical properties of polypyrrole and polyaniline: PhD Thesis. Department of Chemistry, University of Wollongong, Australia, 1993. 312 p.

347. Walter W., Focke G.E., Wnek Y.W. Influence of oxidation state, pH, and counterion on the conductivity of polyaniline // *J. Phys. Chem.* – 1987. - V. 91(22). P. 5813–5818.
348. Burgess R.R. Use of polyethyleneimine in purification of DNA-binding proteins // *Methods Enzymol.* - 1991. - V. 208. P. 3-10.
349. Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine // *Proc. Nat. Acad. Sci.* - 1995. - V. 92. P. 7297–7301.
350. Hernández-Aguirre O.A., Núñez-Pineda A., Tapia-Tapia M., Espinosa R.M.G. Surface modification of polypropylene membrane using biopolymers with potential applications for metal ion removal // *J. Chem.* - 2016. – V. 2016. Article ID 2742013. P. 1-11.
351. Liu D. (ed.) *Handbook of Nucleic Acid Purification* / 2009. - Boca Raton, Florida, USA: CRC Press Taylor & Francis Group. 2009. 584 p.
352. Капустин Д.В., Зубов В.В. Синтез многоцелевых фторполимер- и полианилинсодержащих нанокомпозитов и их применение в биосепарации, боанализе и диагностике // *Вестник МИТХТ.* – 2011. – Т. 6(5). С. 21-46.
353. Капустин Д.В., Сабуров В.В., Завада Л.Л., Евстратов А.В., Барсамян Г.Б., Зубов В.П. Композиционные фторполимерсодержащие сорбенты для выделения и очистки биополимеров // *Биоорганическая химия.* - 1998. - Т. 24(11). С. 868-876.
354. Капустин Д.В., Ягудаева Е.Ю., Завада Л.Л., Жигис Л.С., Зубов В.П., Ярошевская Е.М., Плюбнер Л., Лайзер Р.-М., Брем Г. Композиционный полианилинсодержащий кремнеземный сорбент для выделения ДНК // *Биоорганическая химия.* - 2003. - Т. 29(3). С. 310 - 315.
355. 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: NY. P. 113-136.
356. 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.
357. Liaw D.-J., Yagudaeva E. Yu., Prostyakova A.I., Lazov M.A., Zybin D.I., Ischenko A.A., Zubov V.P., Chang C.-H., Huang Y.-C., Kapustin D.V. Sorption

- behavior of polyaramides in relation to isolation of nucleic acids and proteins // *Colloids Surf., B.* – 2016. – V. 145. P. 912–921.
358. Kapustin D.V., Vikhrov A.A., Gorokhova I.V., Kalyazina O.V., Murzabekova T.G., Zubov V.P. Multicomponent thermosensitive systems for biocatalysts // *Russian Chemical Bulletin, International Edition.* – 2005. - V. 54(2). P. 452—457.
359. Yagudaeva E.Yu., Muydinov M.R., Kapustin D.V., Zubov V.P. Oxidative polymerization of aniline on the surface of insoluble solid poly(sulfonic acids) as a method for the preparation of efficient biosorbents // *Russian Chemical Bulletin, International Edition.* – 2007 - V. 56(6). P. 1166-1173.
360. Yagudaeva E.Yu., Bukina Ya.A., Prostyakova A.I., Zubov V.P., Tverskoy V.A., Kapustin D.V. 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.
361. Ivanov A.E., Belov S.V., Zubov V.P. Structure of the bonded polymeric phases and features of protein separations on composite anion-exchangers // *Polym. Sci. A.* - 1994. - V. 36(2). P. 276–280.
362. Hanson M., Unger K.K. Non-porous polybutadiene-coated silicas as stationary phases in reversed-phase chromatography // *J. Chromatogr.* – 1990. - V. 517. P. 269-284.
363. Hanson M., Eray B., Unger K., Neimark A.V., Schmid J., Albert K., Bayer E. A Model for Polybutadiene Coatings on Porous Silica // *Chromatographia.* – 1993. – V. 35(7/8). P. 403-409.
364. Нефедов П.П., Лавренко П.Н. Транспортные методы в аналитической химии полимеров / Под ред. С.Я. Френкеля. – 1979. - Л.: Химия. 232 с.
365. Перри Дж.Г. Справочник инженера-химика. В 2-х т. – 1969. – Л.: Химия. Т. 1. С. 109-110.
366. Геллер Б.Э., Геллер А.А., Чиртулов В.Г. Практическое руководство по физикохимии волокнообразующих полимеров. – 1996. - М.: Химия. С. 34.
367. Kataev A.D., Reznikova O.A., Kapustin D.V., Zubov V.P. Polytrifluorostyrene-coated silica as a packing for column liquid chromatography // *J. Chromatogr. A.* – 1994. – V. 660(1-2). P. 131-136.
368. Volkmann T., Widdecke H. Fluorination of polyethylene films // *Makromolekulare Chemie-Macromolekular Symposia.* – V. 25. P. 243-248.
369. Соединения фтора: синтез и применение / Под ред. Н. Исикавы. – 1990. – М.: Мир, 407 с.

370. Прудникова О.А. Модификация насыщенных и ненасыщенных полимеров дифторидом ксенона в различных средах: дис. ... канд. хим. наук. М., 1999. 99 с.
371. Hanson M., Unger K.K. Non-porous polybutadiene-coated silicas as stationary phases in reversed-phase chromatography // *J. Chromatogr.* – 1990. – V. 517. P. 269-284.
372. Hanson M., Eray B., Unger K., Neimark A.V., Schmid J., Albert K., Bayer E. A Model for Polybutadiene Coatings on Porous Silica // *Chromatographia.* – 1993. – V. 35(7/8). P. 403-409.
373. Мейсон Т., Линдли Дж., Дэвидсон Р., Лоример Дж., Гудвин Т. Химия и ультразвук / Пер. с англ. под ред. А.С. Козьмина. – 1993. – М.: Мир, 190 с.
374. Schmid G., Rommel O. Zerreißen von Makromolekülen mit Ultraschall // *Z. Physikal. Chem. A.* – 1939. – V. 185 (2). P. 97
375. Zubov V.P., Chikhacheva I.P., Nikolaeva E.I., Kapustin D.V., Yagudaeva E.Yu., Kubrakova I.V. Microwave-assisted synthesis of composite sorbents on the basis of silica modified by polyvinyl alcohol // *Russian Journal of General Chemistry.* - 2009. - T. 79(2). С. 191-194.
376. Барсамян Г.Б. Применение дифторида ксенона для поверхностной модификации полимерных материалов: дис. ... канд. хим. наук. Москва. 1994. 119 с.
377. Kogan Y.L., Davidova G.I., Knerelman E.I., Gedrovich G.V., Fokeeva L.S., Emelina L.V., Savchenko V.I. Kinetic peculiarities of chemical aniline polymerization // *Synth. Met.* – 1991. – V. 41(3). P. 887-890.
378. Wei Z.X., Wan M.X. Synthesis and characterization of self-doped poly(aniline-co-aminonaphthalene sulfonic acid) nanotubes // *J. of Applied Polymer Science.* – 2003. – V. 87(8). P. 1297-1301.
379. Ivanov V.F., Gribkova O.L., Cheberyako K.V., Nekrasov A.A., Tverskoy V.A., Vannikov A.V. Template synthesis of polyaniline in the presence of poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid) // *Russian Journal of Electrochemistry.* – 2004. – V. 40(3). P. 299-304.
380. Guseva M.A., Isakova A.A., Gribkova O.L., Tverskoi V.A., Ivanov V.F., Vannikov V.F., Fedotov Yu.A. Matrix polymerization of aniline in the presence of polyamides containing sulfo groups // *Polymer Science Series A.* – 2007. – V. 49 (1). P. 4-11.

381. Robin J.J. Overview of the use of ozone in the synthesis of new polymers and the modification of polymers // *New Synthetic Methods* / in: *Adv. Polym. Sci.* - 2004. - V. 167. P. 35-80.
382. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Ryazantcev D.Yu., Zubov V.P. 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.
383. 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. 2015.
384. Капустин Д.В., Тарасов А.В., Простякова А.И., Лепешин С.А. Сорбционная композитная мембрана и биосепарирующее устройство для выделения ДНК. Патент РФ № 2631934 С1. 2017.
385. Иванов В.К., Баранов А.Н., Капустин Д.В., Третьяков Ю.Д.. Формирование фрактальной структуры поверхности порошков Fe_2O_3 // *Неорганические материалы* - 1997. Т. 33(7). С. 830-834.
386. Gram H.C. Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten // *Fortschritte der Medizin: magazin.* - 1884. - Bd. 2. - S. 185-189.
387. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* - 1976. - V. 72 (1-2). P. 248-254.
388. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Alexeev Ya.I., Varlamov D.A., Zubov V.P., Zavriev S.K. High-throughput method of one-step DNA isolation for PCR diagnostics of *Mycobacterium tuberculosis* // *Acta Naturae.* 2014. – V. 6 № 2 (21). С. 6-10.
389. H. Zetzsche, H.-P. Klenk, M.J. Raupach, T. Knebelsberger, B. Gemeinholzer. Comparison of methods and protocols for routine DNA extraction in the DNA Bank Network // *DNA Bank Network.* URL: <https://www.dnabank-network.org>. [Дата обращения: 05.08.2019].
390. Jahr S., Hentze H., Englisch S., Hardt D., Fackelmayer F.O., Hesch R.D., Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells // *Cancer Res.* – 2001. - V. 61(4). P. 1659-1665.

391. Laktionov P.P., Tamkovich S.N, Rykova E.Y., Bryzgunova O.E., Starikov A.V., Kuznetsova N.P., Sumarokov S.V., Kolomiets S.A., Sevostianova N.V., Vlassov V.V. Extracellular circulating nucleic acids in human plasma in health and diseases // *Nucleoside Nucleotides Nucleic Acids*. - 2044. - V. 23(6-7). P. 879-883.
392. Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy // *Cancer Res*. - 1977. - V. 37. P. 646-650.
393. Vasilyeva I.N. Low-molecular-weight DNA in blood plasma as an index of the influence of ionizing radiation // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2001. - V. 945. P. 221-228.
394. Lo Y.M., Rainer T.H., Chan L.Y., Hjelm N.M., Cocks R.A. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients // *Clin. Chem.* – 2000. – V. 46(3). P. 319-323.
395. Koffler D., Agnello V., Winchester R., Kunkel H.G. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases // *J. Clin. Invest.* - 1973. - V. 52. P. 198-204.
396. Lo Y.M.D., Tein M.S.C., Lau T.K., Haines C.J., Leung T.N., Poon P.M.K, Wainscoat J.S., Johnson P.J., Chang A.M.Z., Hjelm N.M. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis // *Am. J. Hum. Genet.* 1998. - V. 62(4). P. 768-775.
397. Loeb K.R., Jerome K.R., Goddard J., Huang M., Cent A., Corey L. High-throughput quantitative analysis of hepatitis B virus DNA in serum using the TaqMan fluorogenic detection system // *Hepatology*. - 2000. - V. 32(3). P. 626-629.
398. Yaroslavtseva N.G., Garanzha T.A., Bagryantseva S.J., et al. Virus DNA of hepatitis B in a blood plasma of the HBsAg-negative donors and patients // *Inf. Bull. Transfus. News*. - 2002. - V. 30. P. 23-29.
399. Kay A., Zoulim F. Hepatitis B virus genetic variability and evolution // *Virus Res*. - 2007. - V. 127(2). P. 164-176.
400. Hino S. Review. TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome // *Rev. Med. Virol.* - 2002. - V. 12(3). P. 151-158.
401. Ivanova V.T., Garina E.O., Burtseva E.I., Kirillova E.S., Ivanova M.V., Stejskal J., Sapurina I.Yu. Conducting polymers as sorbents of influenza viruses // *Chemical Papers*. - 2017. - V. 71(2). - P. 495-503.
402. Львов Д.К., Урываев Л.В. Тогавирусы (Togaviridae) // *Медицинская вирусология: руководство* / Под ред. Д.К. Львова. – 2008. – М.: МИА. С. 217-224.

403. Капустин Д.В., Орлов А.В., Карпачева Г.П. Межфазная окислительная полимеризация анилина // Юбилейная научная сессия ИНХС РАН. - 1994. - М.: изд-во ИНХС РАН. - 12-14 окт., 1994.- С. 3.
404. Рясенский С.С., Васильева Д.В. Полианилин как адсорбент катионов Cu^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} из растворов солей // Вестник ТвГУ. Серия «Химия». - 2015. - № 3. С. 19-22.
405. Smalla K., Cresswell N., Mendoncahagler L.C., Walters A., Vanelsas J.D. Rapid DNA extraction protocol from soil for polymerase chain reaction-mediated amplification // *Journal of Applied Bacteriology*. - 1993. - V. 74(1). P. 78-85.
406. Porteous L.A., Armstrong J.L. Recovery of bulk DNA from soil by a rapid, small-scale extraction method // *Current Microbiology*. - 1991. - V. 22(6). P. 345-348
407. Porteous L.A., Armstrong J.L. A simple mini-method to extract DNA directly from soil for use with polymerase chain reaction amplification // *Current Microbiology*. - 1993. - V. 27(2). P. 115-118.
408. Cullen D.W., Hirsch P.R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR // *Soil Biology and Biochemistry*. - 1998. - V. 30(8-9). P. 983-993.
409. Tsai Y.L., Olson B.H. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1992. - V. 58(7) P. 2292–2295.
410. Janos P. Separation methods in the chemistry of humic substances // *Journal of Chromatography A*. – 2003. – V. 983(1-2). P. 1-18.
411. resDNASEQ™ Quantitative CHO DNA Kit User Guide. URL: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4469838.pdf> . [Дата обращения: 19.09.2019].
412. Orlov D.S. Humic substances of soils and general theory of humification / V.S. Kothekar (Ed). - 1995. - Rotterdam, Netherlands: A A Balkema Publishers. 266 p.
413. Humic substances: structures, properties and uses / G. Davies, E.A. Ghabbour (Eds). - 1998. - Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry. 133 p.
414. Richard G., Guyot G., Aguer J.-P., Ter Halle A., Trubetskaya O.E, Trubetskoi O.A. Role of fractionation in studying the photochemical properties of humic substances. // *Russian Journal of General Chemistry*. - 2008. - V. 78(11). P. 2265-2272.
415. Saiz-Jimenez C., Trubetskaya O.E., Trubetskoj O.A., Hermosin B. Polyacrylamide gel electrophoresis of soil humic acids, lignins, model phenolic polymers, and fungal

- melanins // *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. - 1999. - V. 30(3-4). P. 345-352.
416. Trubetskoj O.A., Trubetskaya O.E. Khomutova T.E. Isolation, purification and some physicochemical properties of soil humic substances fractions obtained by polyacrylamide-gel electrophoresis // *Soil Biology and Biochemistry*. - 1992. - V. 24(9). P. 893-896.
417. Прямое секвенирование ПЦР-продукта. Энциклопедия научной библиотеки. URL: <http://enc.sci-lib.com/article0001420.html> [Дата обращения: 22.09.2019].
418. Genome analysis. A practical approach / К.Е. Davies (Ed.) – 1988. – Oxford, Washington DC, USA: IRL Press Limited. 208 p.
419. Guzaev A.P., Pon R.T. Attachment of Nucleosides and other linkers to solid-phase supports for oligonucleotide synthesis // *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* – 2013. – V. 52. P. 3.2.1 - 3.2.23.
420. «ДНК-синтез». Справочная информация. Олигонуклеотиды. URL: <http://www.oligos.ru/spravka-oligos.html> [Дата обращения: 01.10.2019].
421. Левина А.А., Мелик-Нубаров Н.С., Казюкова Т.В., Кузьмина Н.С., Цветаева Н.В. Разработка иммуноферментного метода для определения витамина В12 и фолиевой кислоты // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2002. -№ 4. С. 13-15.
422. Handbook of vitamins. 4th Edition / J. Zempleni, R.B. Rucker, D.B. McCormick, J.W. Suttie (Eds.). – 2007. – Boca Raton, London, New York: CRC Press, Taylor & Francis Group. 592 p.
423. Чиркин А.А. Практикум по биохимии. – 2002. - Минск: Новое знание. 512 с.
424. Королева Г.Н., Туркина Л.А. Определение жирорастворимых витаминов в лекарственных препаратах методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Тезисы VII конференции "Аналитика Сибири и Дальнего Востока – 2004. URL: <http://www.anchem.ru/literature/books/asdv-2004/373.asp> [Дата обращения: 09.09.2019].
425. Ассоциация Современные аналитические технологии. – 2010. - URL: <http://www.asat.ru/analit/food-2.htm> [Дата обращения: 10.09.2019].
426. URL: <https://recipe.de/hplc-complete-kits/> [Дата обращения: 10.09.2019].
427. Зайцева И.П., Серебрянский Е.П., Скальная М.Г., Капустин Д.В. Аминокислотный и витаминный профили сыворотки крови студенток ВУЗа, занимающихся спортом // *Вестник восстановительной медицины*. - 2014. - Т. 2(60). С.62-65.

428. URL: <https://topuch.ru/vitamini-vitamini/index.html> [Дата обращения: 05.09.2019].
429. Issaq H.J., Veenstra T.D., Conrads T.P., Felschow D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* - 2002. - V. 292(3). P. 587–592.
430. El-Aneed A., Cohen A.M., Banoub J. Mass spectrometry, review of the basic: electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers // *Applied Spectroscopy Reviews.* - 2009. - V. 44(3). P. 210-230.
431. Liam M.H., Jones D.J.L., Suzuki T. Mass spectrometry in medicine: a technology for the future? // *Future Science OA.* - 2017. - V. 3(3). FSO213. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5583653/?report=classic> [Дата обращения: 09.10.2019].
432. Generalova A.N., Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifullina M.M., Artemyev M.V., Baranov A.V., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Deyev S.M. Submicron polymer particles containing fluorescent semiconductor nanocrystals CdSe/ZnS for bioassays // *Nanomedicine.* – 2011. V. 6(2). P. 195-209.
433. 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).
434. Zubov V.P., Kapustin D.V., Generalova A.N., Yagudaeva E.Yu., Vikhrov A.A., Sizova S.V., Muydinov M.R. Modification of solids with polymer nanolayers as a process for manufacture of novel biomaterials. *Polymer Science Series A.* 49 (12), 1247-1264, (2007).
435. 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* 6(7), 957–966 (2014).
436. 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), 2006.
437. Zubov V.P., Plobner L., Kapustin D.V., Balayan H., Muydinov M., Brem G., Leiser R.-M. Sorbent material having a covalently attached perfluorinated surface with functional groups. Patent US 2006243658, 2006.
438. 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, 2007.

439. 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, 2008.