

СЕДЬМАЯ ВСЕРОССИЙСКАЯ КАРГИНСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ «Полимеры — 2017»



Разработка полимерсодержащих композиционных сорбентов и их применение в молекулярной биотехнологии для выделения и очистки нуклеиновых кислот, белков и пептидов

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)

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

Лаборатория «Полимеры для биологии»

[В.П. Зубов](#), [Д.В. Капустин](#)

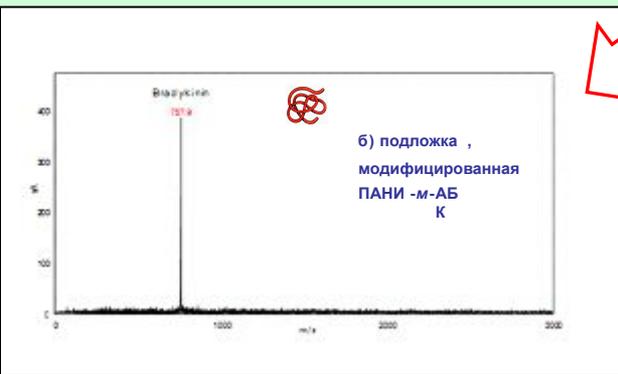
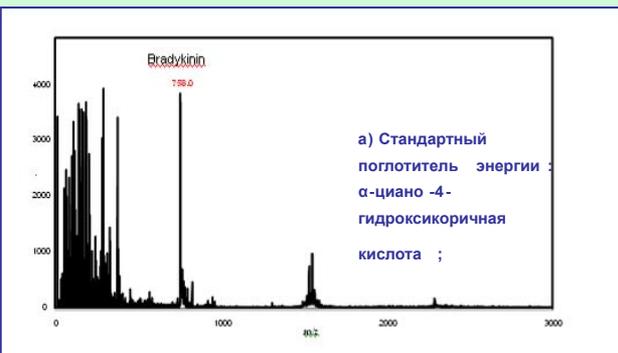


МОСКВА 13–17 июня 2017 г.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ



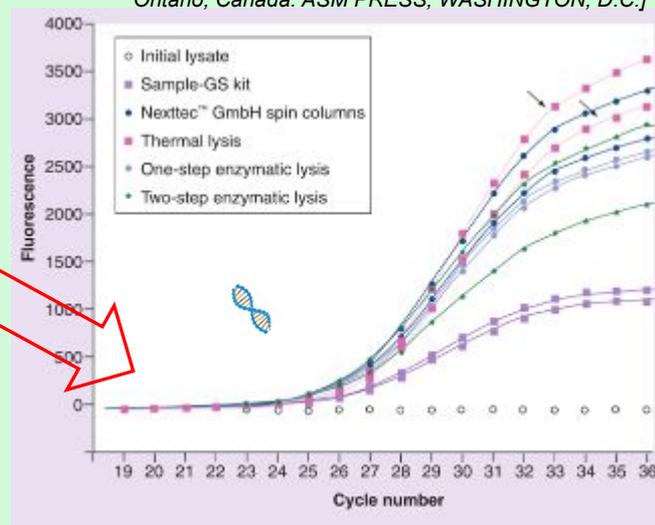
Определение брадикинина методом **SELDI-TOF MS** на кремниевых пластинах, модифицированных ПАНИ-м-АБК



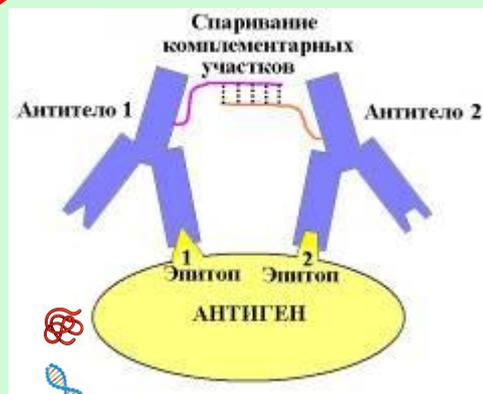
ЛИЗАТ:



[Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA. SECOND EDITION. Bernard R. Glick, Jack J. Pasternak
Department of Biology, University of Waterloo Waterloo, Ontario, Canada. ASM PRESS, WASHINGTON, D.C.]



Human DNA amplification in PCR.



Immuno-PCR

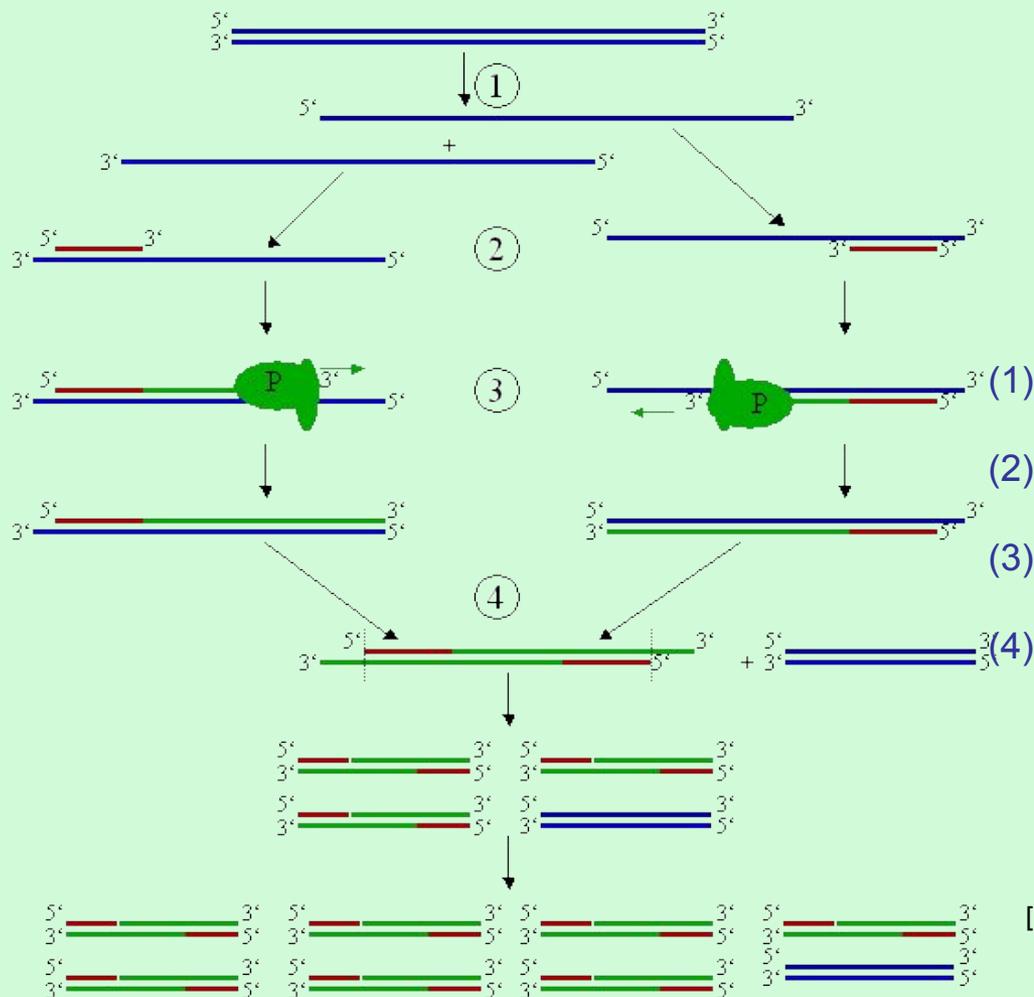
ПРИМЕНЕНИЯ: PCR, NASBA, Immuno-PCR, SELDI-TOF MS, etc...

ВО ВСЕХ СЛУЧАЯХ НЕОБХОДИМА ЭФФЕКТИВНАЯ ПРОБОПОДГОТОВКА

Схематическое изображение первого цикла ПЦР



Kary Mullis



(1) Денатурация при 94—96°C.

(2) Отжиг при 68 °C (например).

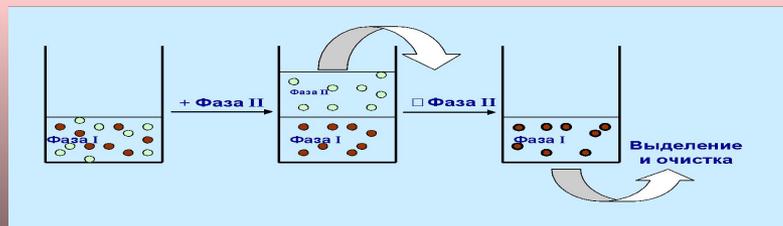
(3) Элонгация при 72 °C (P - полимераза).

Закончен первый цикл. Две получившиеся ДНК-цепи служат матрицей для следующего цикла, поэтому количество матричной ДНК в ходе каждого цикла удваивается.

[<https://ru.wikipedia.org/wiki/Файл:Pcr.png>]

Многостадийные процессы выделения

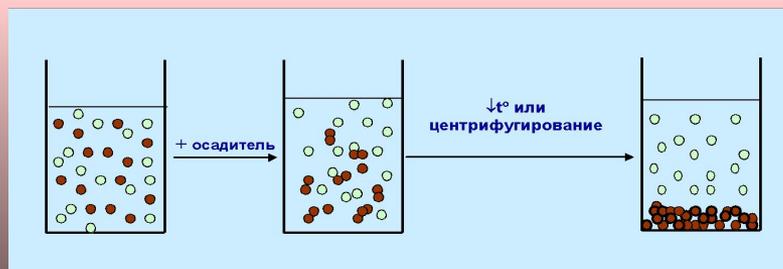
ЭКСТРАКЦИЯ



Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction // *Anal. Biochem* – 1986 – 162. p. 156–159

Biochem – 1986 – 162. p. 156–159

ОСАЖДЕНИЕ



Carr S.M., Griffiths O.M. Preparative density-gradient ultracentrifugation of DNA // *Biochem Genet* – 1987 – 25. p.385-390.

Zeugin JA, Hartley JL. Ethanol Precipitation of DNA // *Focus* – 1985 - 7(4).p.1–2.

АДСОРБЦИЯ ЦЕЛЕВОГО КОМПОНЕНТА например, НК из смеси



Lehmann U. et al. Droplet-based DNA purification in a magnetic lab-on-a-chip. // *Angew. Chem.* – 2006 – *Int. Edn* 45. p. 3062–3067

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. // *J. Clin. Microbiol.* – 1990 – 28(3). p. 495-503

Одностадийное выделение

АДСОРБЦИЯ

ПРИМЕСЕЙ ИЗ СМЕСИ с высвобождением целевого компонента, например, НК

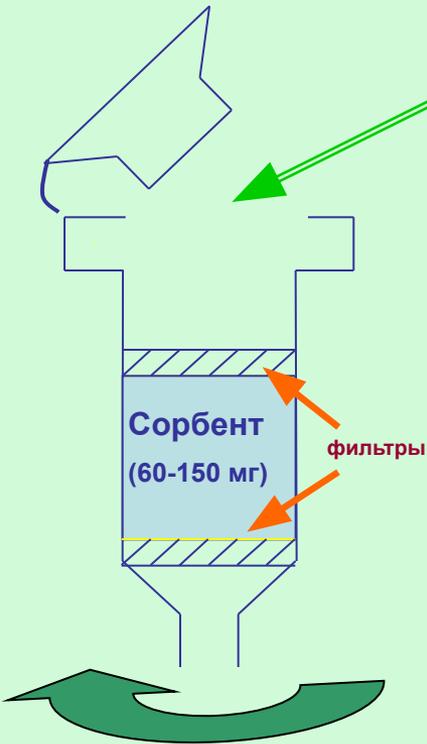


Zubov V.P., Plobner L., Kapustin D.V., Balayan H., Muydinov M., Brem G., Leiser R.-M. Sorbent material having a covalently attached perfluorinated surface with functional groups. US 2006243658, 02.11.2006.

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. US 20080015341A1, 01.17.2008.

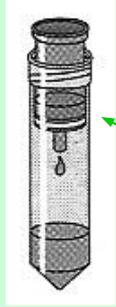
Экспресс-разделение нуклеиновых кислот и белков

Клеточный лизат (ДНК, РНК, белки, пептиды, полисахариды, низкомолекулярные компоненты и пр.) или модельная смесь

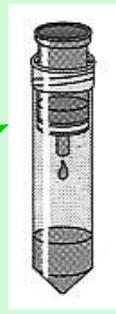


Белки, пептиды

1



Сорбент



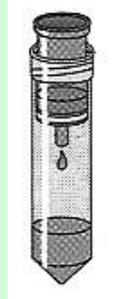
1



ДНК (РНК)

2

ДНК (РНК)



2

Элюент (например, водно-органическая смесь)

Белки, пептиды

Центрифугирование, продавливание или элюция самотеком

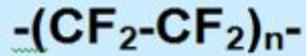
3



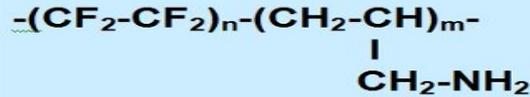
Белки

ФТОРПОЛИМЕРЫ

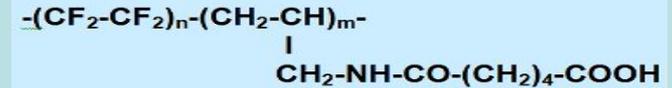
A



B

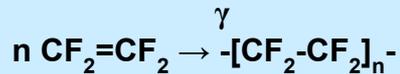


B

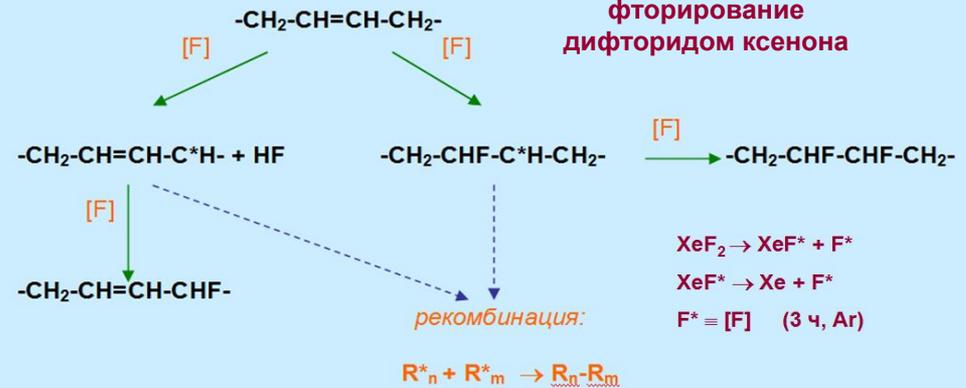


A – политетрафторэтилен;
B,B – замещенные полифторбутадиены

Радиационная пост-полимеризация

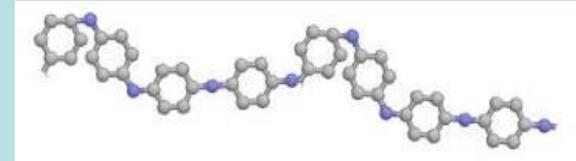
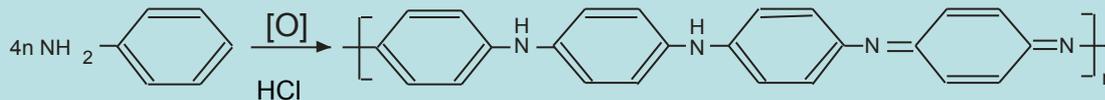


Химическое отверждение

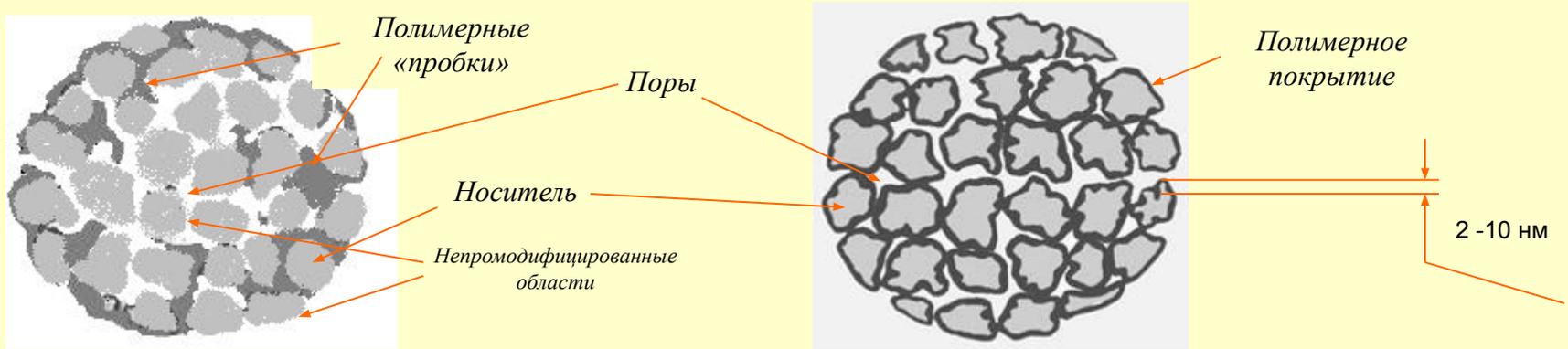


ПОЛИАНИЛИН

Окислительная осадительная полимеризация



- путь к получению морфологически совершенных композитов



Синтез в присутствии неактивного носителя - неоднородное покрытие:

- низкая селективность,
- низкая химическая стабильность,
- низкая сорбционная емкость

Непокрытая поверхность - нежелательная неспецифическая сорбция

Прямой синтез на активированной матрице - однородное покрытие:

- низкая неспецифическая сорбция,
- высокая селективность,
- высокая химическая стабильность

Сохранение исходной пористости носителя:

- высокая удельная площадь поверхности,
- однородное распределение функциональных групп по поверхности,
- интенсификация химических и сорбционных процессов

Некоторые оригинальные работы:

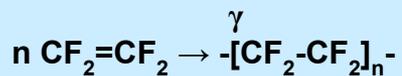
[1] - Kapustin DV, Yagudaeva EY, Zubov VP, et al. "New Polymer-Coated Materials for One-Step Separation of Nucleic Acids". In: *Frontiers in DNA Research*. Woods CR (Ed), Nova Science Publishers, USA, 113 -136 (2006).

[2] - Zubov VP, Kapustin DV, Generalova AN, et al. Modification of Solids with Polymer Nanolayers as a Process for Manufacture of Novel Biomaterials. *Polymer Science Series A*. 49 (12), 1247-1264, (2007).

[3] - Yagudaeva EYu, Muysidinov MR, Kapustin DV and Zubov VP. Oxidative polymerization of aniline on the surface of insoluble solid poly (sulfonic acids) as a method for the preparation of efficient bioadsorbents. *Rus. Chem. Bulletin Int. Ed*. 56 (6), 1166-1173, (2007).

[4] - Kapustin DV, Prostyakova AI, Ryazantcev DYU, Zubov VP. Novel composite matrices modified with nanolayers of fluoropolymers as perspective materials for bioseparation and bioanalysis. *Nanomedicine*, 6, No 2, 241-255 (2011).

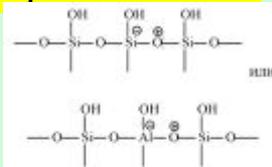
I. ПТФЭ-сорбент



1. Вакуумирование частиц кремнезема

2. Введение мономера (ТГФ) в систему с носителем

3. Намораживание мономера на поверхность кремнезема



4. Обработка γ -излучением

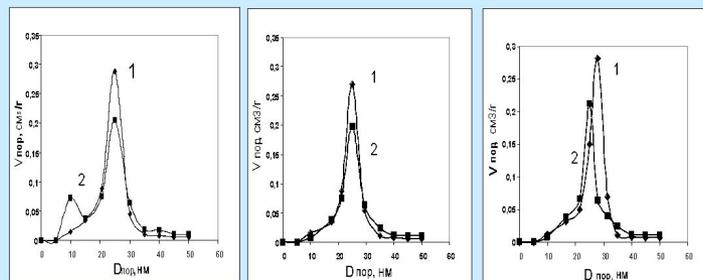
5. Разогрев системы (пост-полимеризация)

6. Энд-кэппинг (обработка ГФП)

6. Вакуумирование системы (очистка продукта)

7. Тестирование и использование

Схемы получения полимер-модифицированных кремнеземных сорбентов на неактивированных носителях



Структура А
режимы 1 и 2



Структура Б
режим 3
(после предварительной сорбции ТГФ)



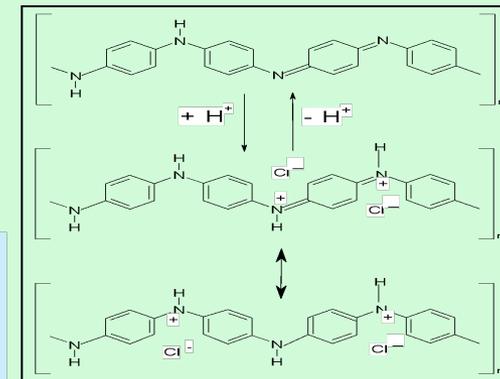
Структура В
режим 4
(без предварительной сорбции ТГФ)



Полимеризация анилина
в присутствии
кремнезема

II. ПАНИ-сорбент

8



1. Вакуумирование частиц кремнезема

2. Введение раствора мономера (анилина) в присутствии кислоты

активация мономера:

3. Введение раствора окислителя

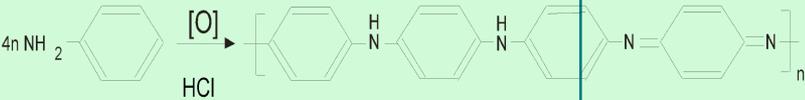
4. Полимеризация

5. Отмывка продукта от несвязанных частиц ПАНИ (до 60% мас.)

6. Вакуумная сушка продукта

7. Тестирование и использование

Получение композитов для выделения/очистки биополимеров

СУЩНОСТЬ МЕТОДА	МОДИФИКАТОР	ПРИМЕНЕНИЕ	ССЫЛКИ
МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ПОЛИМЕРИЗАЦИИ В ПРИСУТСТВИИ НЕАКТИВИРОВАННЫХ НОСИТЕЛЕЙ			
<p>Радиационная пост-полимеризация ТФЭ в присутствии носителя</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: fit-content; margin: 10px auto;"> $n \text{CF}_2=\text{CF}_2 \xrightarrow{\gamma} -[\text{CF}_2-\text{CF}_2]_n-$ </div>	ПТФЭ-ГФП	<p>Одностадийное выделение ДНК из сложных смесей (очистка плазмидной ДНК)</p> <p>Разделение смесей пептидов и/или белков по обращенно-фазному механизму</p>	<p>Ivanov A.E., Saburov V.V., Zubov V.V. Polymer-coated adsorbents for separation of bio-polymers // Adv. in Polym. Sci. 1992. V. 104. P. 135-175.</p>
<p>Окислительная полимеризация анилина в присутствии неактивированного носителя</p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  </div>	ПАНИ	<p>Одностадийное выделение ДНК из сложных смесей (бактериальные лизаты, выделение ДНК вируса гепатита В из крови, выделение ДНК из растений и т.д.)</p> <p>Разделение смесей пептидов и/или белков в градиенте pH в зависимости от значения pI сорбата</p>	<p>Д.В. Капустин, Е.Ю. Ягудаева, Л.Л. Завада, Л.С. Жигис, В.П. Зубов, Е.М. Ярошевская, Л. Пlobнер, Р.-М. Лайзер, Г. Брем. Композиционный полианилинсодержащий кремнеземный сорбент для выделения ДНК. – Биоорганическая химия, 2003, т. 29, № 3, с. 310 - 315.</p> <p>Leiser R.-M., Plobner L., Yaroshevskaya E. M., Zubov V. P., Капустин D. V., Yagudaeva E. Yu. Use of a composite polymer-coated sorbent for separation, purification, desalting and concentration of biopolymers. WO 0064579 (A1), 14.09.2006.</p>

СУЩНОСТЬ МЕТОДА	МОДИФИКАТОР	ПРИМЕНЕНИЕ	ССЫЛКИ
-----------------	-------------	------------	--------

**МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ
НА ПРЕДВАРИТЕЛЬНО АКТИВИРОВАННОЙ (ФУНКЦИОНАЛИЗОВАННОЙ) ПОВЕРХНОСТИ НОСИТЕЛЯ**

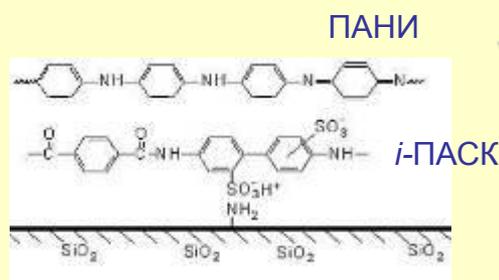
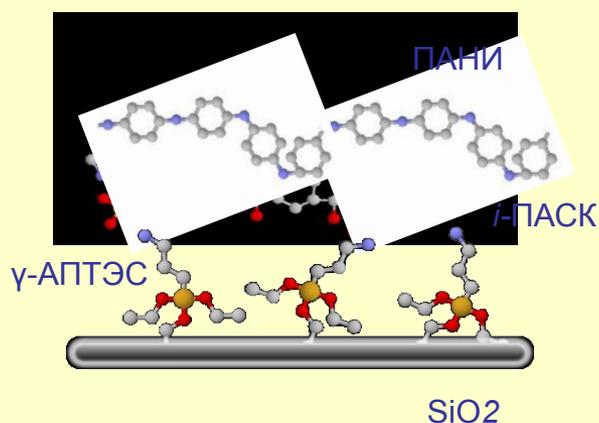
«Матричная» полимеризация анилина на полисульфокислотах (ПСК) в присутствии силанированного носителя

ПСК-ПАНИ

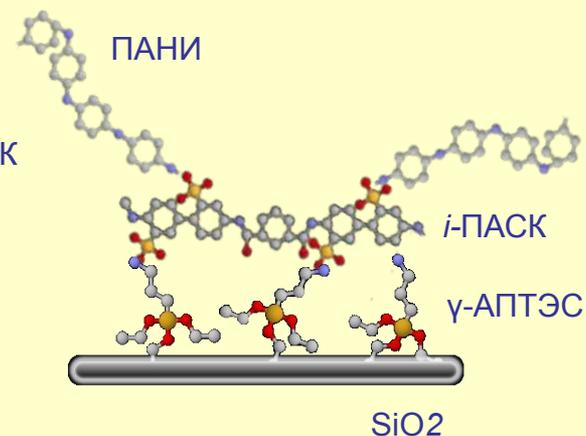
Полимеризация в приповерхностном слое носителя, выступающего в качестве *«гетерогенного источника протонов»*.

Одностадийное выделение ДНК из сложных смесей (бактериальные лизаты, выделение ДНК из растений и т.д.)

E.Yu. Yagudaeva, Ya.A. Bukina, A.I. Prostyakova, V.P. Zubov, V.A. Tverskoy, and **D.V. Kapustin**. Oxidative Polymerization of Aniline on the Surface of Silica in the Presence of Poly(sulfonic acids) as a Method of Preparing Efficient Biosorbents. *Polymer Science, Ser. A*, 2009, Vol. 51, No. 6, pp. 675 – 682.



Интраполимерный комплекс i-ПАСК-ПАНИ



I ВАРИАНТ:

Матричная полимеризация в растворе в отсутствие носителя с образованием поликомплекса ПСК-ПАНИ с последующей сорбцией поликомплекса на активированной поверхности носителя

II ВАРИАНТ:

иммобилизация полисульфокислоты на активированном носителе

Получение композитов для выделения/очистки биополимеров

СУЩНОСТЬ МЕТОДА	МОДИФИКАТОР	ПРИМЕНЕНИЕ	ССЫЛКИ
-----------------	-------------	------------	--------

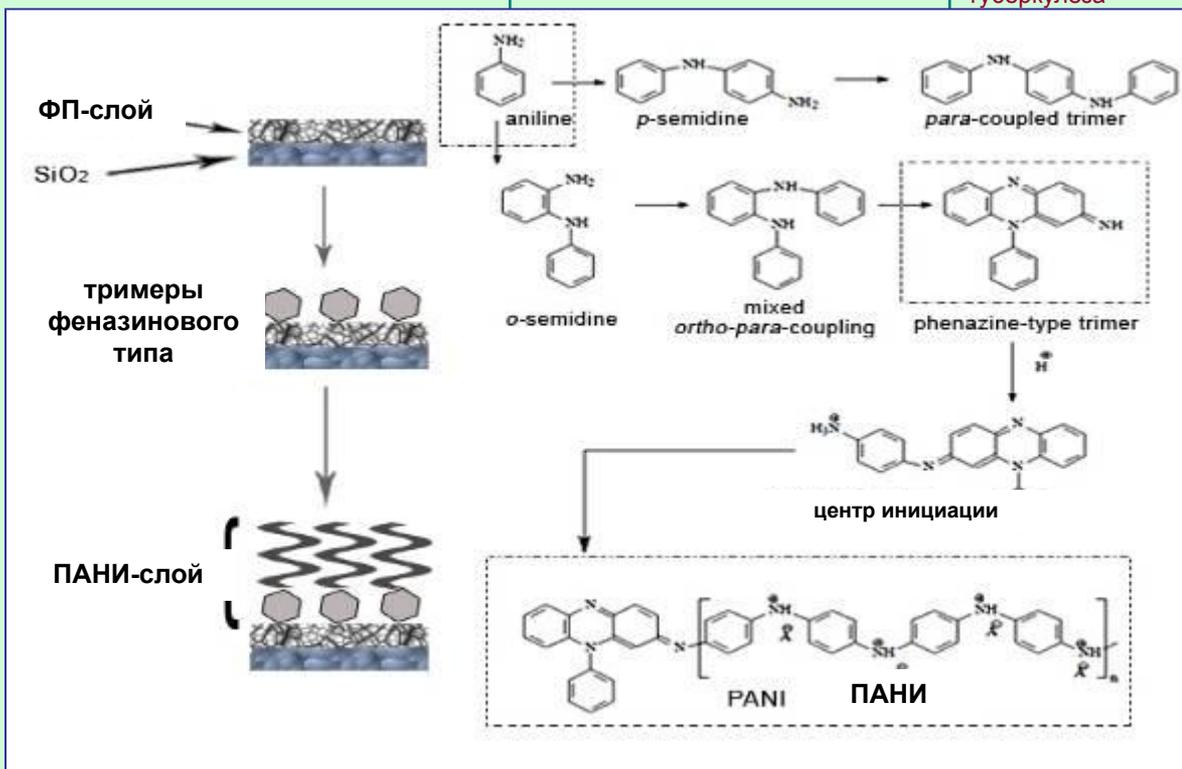
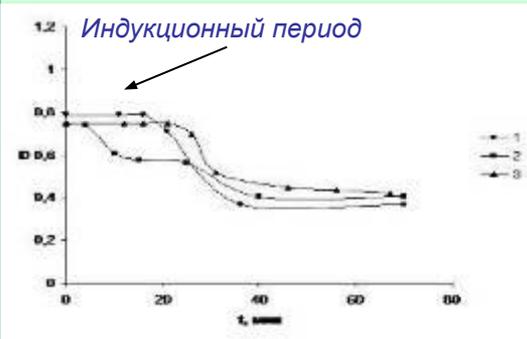
МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ НА ПРЕДВАРИТЕЛЬНО АКТИВИРОВАННОЙ (ФУНКЦИОНАЛИЗОВАННОЙ) ПОВЕРХНОСТИ НОСИТЕЛЯ

Матричная полимеризация анилина на гидрофобизованной (фторированной) поверхности носителя

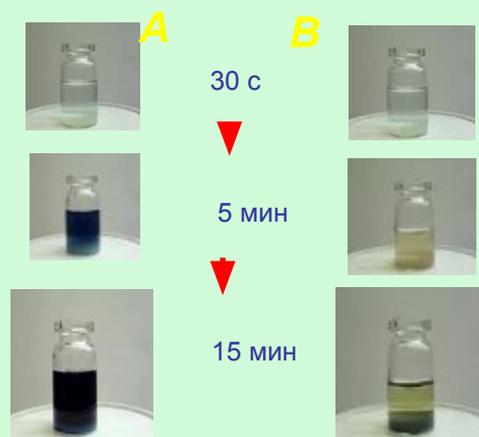
ФП-ПАНИ

Иммобилизация фторполимера на поверхности носителя (кастинг)
 Полимеризация анилина в приповерхностном слое носителя, выступающего *в качестве «гидрофобной матрицы»*

Одностадийное выделение ДНК из сложных смесей (бактериальные лизаты, выделение ДНК из растений, из крови и т.д.).
 Определение возбудителей урогенитальных инфекций туберкулеза



Кинетические кривые расхода мономера при полимеризации анилина



Д.В. Капустин, В.П. Зубов. Синтез универсальных фторполимер- и полианилинсодержащих нанокompозитов и их применение в биосепарации и биоанализе // Вестник МИТХТ (2011). Т. 6 № 5, с.с. 21-46.

СУЩНОСТЬ МЕТОДА	МОДИФИКАТОР	ПРИМЕНЕНИЕ	ССЫЛКИ
-----------------	-------------	------------	--------

МЕТОДЫ, ОСНОВАННЫЕ НА ЛОКАЛИЗАЦИЯ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ НА ПРЕДВАРИТЕЛЬНО АКТИВИРОВАННОЙ (ФУНКЦИОНАЛИЗОВАННОЙ) ПОВЕРХНОСТИ НОСИТЕЛЯ

«Озон-индуцированная» радикальная (со)полимеризация фтормономеров и/или виниловых мономеров
 Активация поверхности носителя (обработка озоном)
 «Озон-индуцированная» окислительная полимеризация анилина

ПТФЭ, ПТФЭ-АА, ПТФЭ-АС

Полимеризация ТФЭ и введенных сомономеров (в газообразной среде) в приповерхностном слое носителя, выступающего *в качестве гетерогенного инициатора*

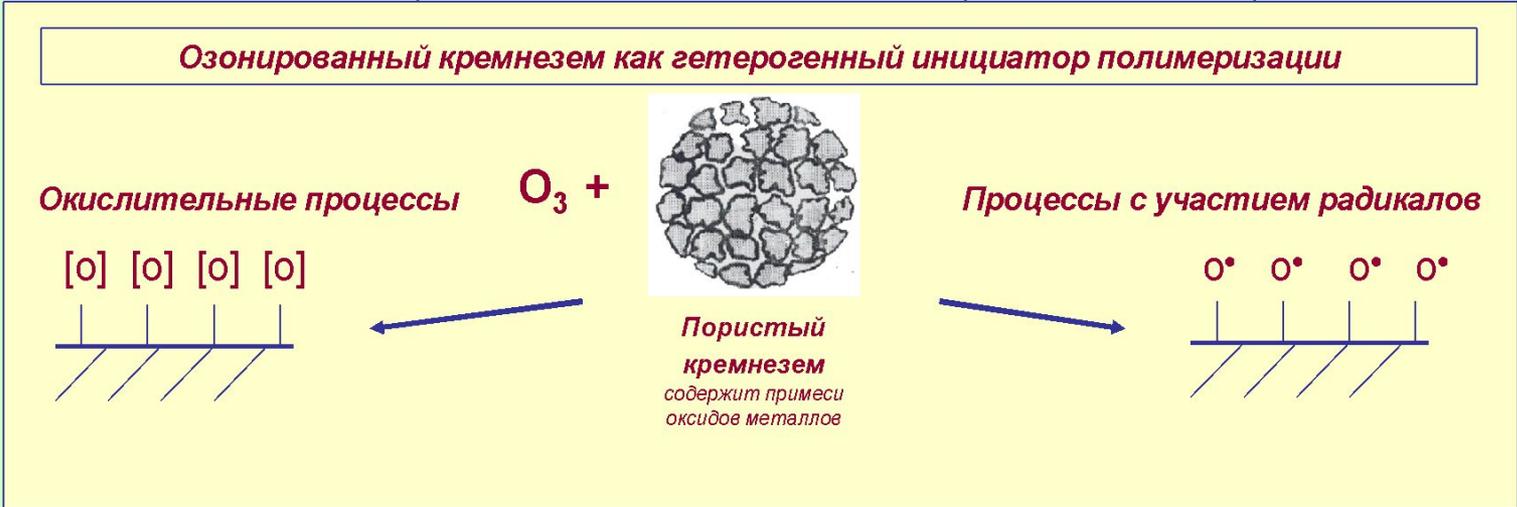
ПАНИ

Полимеризация (в жидкой среде) в приповерхностном слое носителя, выступающего *в качестве гетерогенного инициатора*

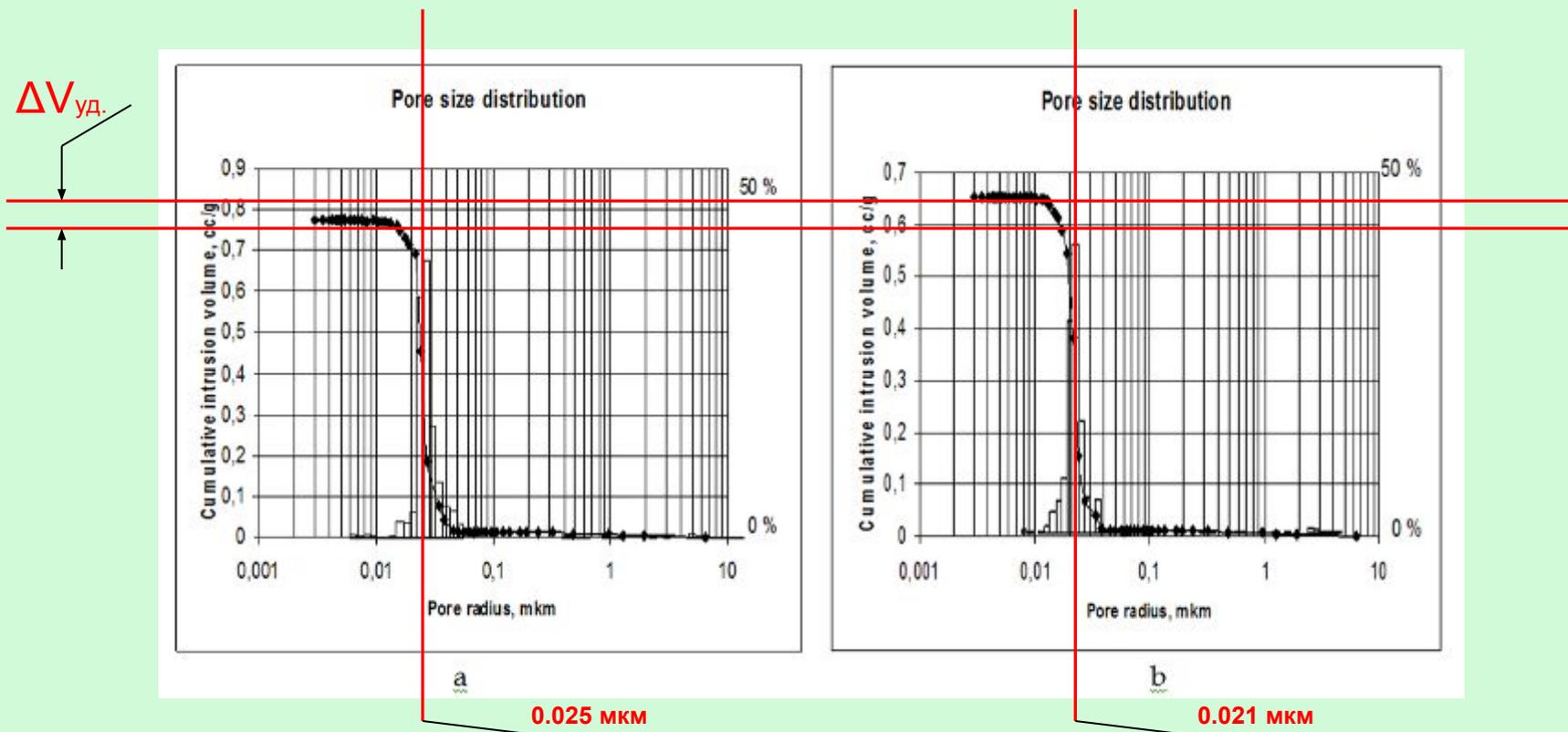
Одностадийное выделение ДНК из сложных смесей

D.V. Kapustin, A.I. Prostyakova, D.Yu. Ryazantcev, V.P. Zubov. Novel composite matrices modified with nanolayers of fluoropolymers as perspective materials for separation of biomolecules and bioanalysis. *Nanomedicine*. Vol. 6(2), (2011). P. 241-255.

A.I. Prostyakova, **D.V. Kapustin**. Development of a new methods of fluoropolymer nanolayers formation on the ozone-treated solid matrices for the preparation of effective bioadsorbents // *Вестник КазНУ. Серия химическая (Хабарши вестник. Химия сериясы)*. №4(60). 2010. С. 187–189.



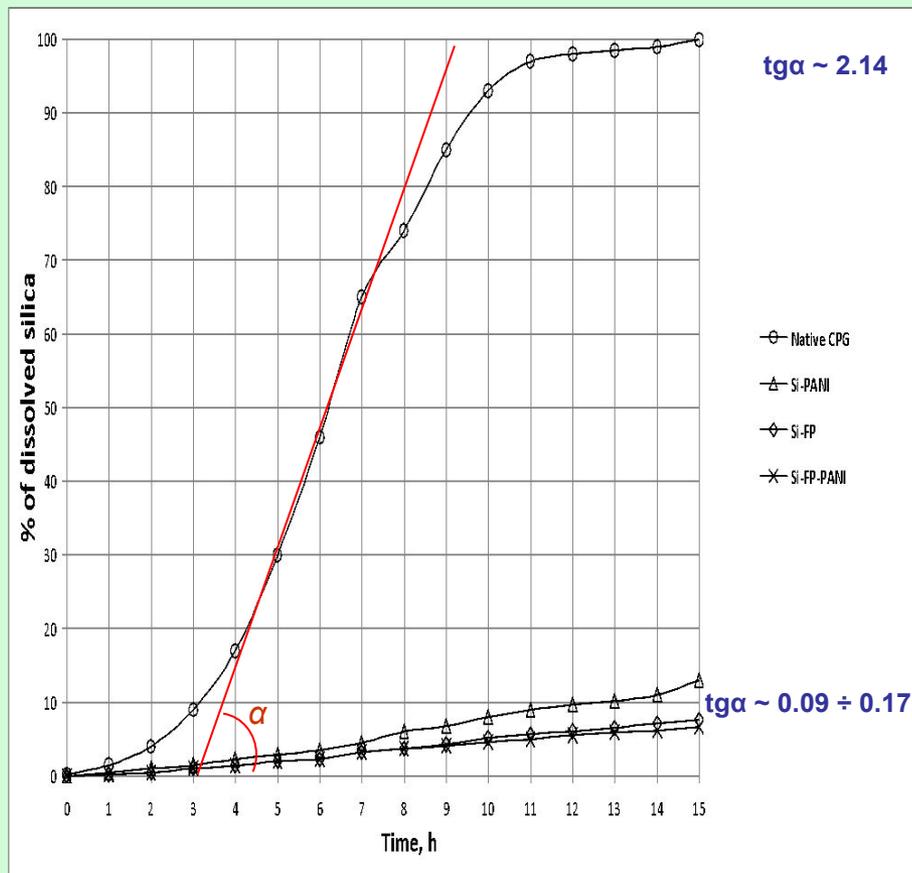
Подтверждение однородности ПАНИ-покрытия методом ртутной порометрии



a) – немодифицированный кремнезем, $d_{\text{пор ср.}} \sim 50 \text{ нм}$; $V_{\text{пор, уд.}} \sim 0.78 \text{ см}^3/\text{г}$;

b) – ПАНИ-содержащий кремнезем (окислительная осадительная полимеризация), $d_{\text{пор ср.}} \sim 42 \text{ нм}$; $V_{\text{пор, уд.}} \sim 0.65 \text{ см}^3/\text{г}$; эффективная толщина полимерного покрытия $\sim 40 \text{ \AA}$.

Подтверждение однородности полимерного по результатам определения гидролитической стабильности композиционного сорбента ПРО Тg



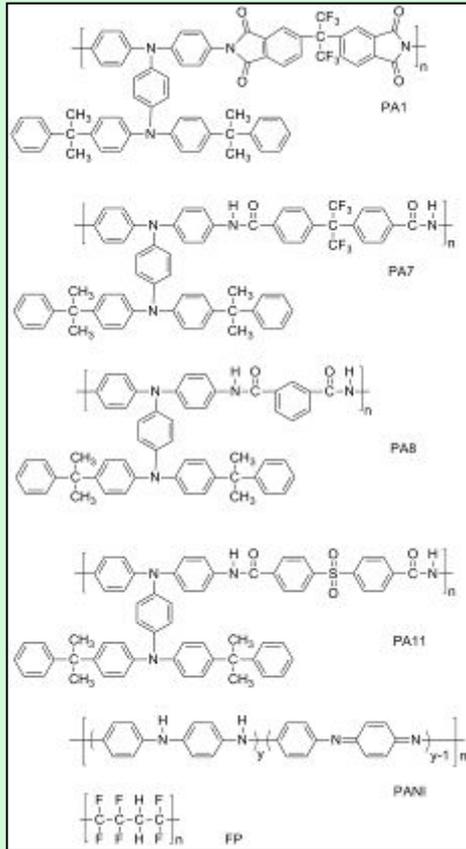
Химическая стабильность кремнеземного сорбента, модифицированного ПТФЭ

Гидролитическая стабильность ПАНИ-сорбента возрастает, примерно, в 10 раз по сравнению со стабильностью исходного немодифицированного кремнезема, а ФП-ПАНИ-сорбента – в 20 раз.

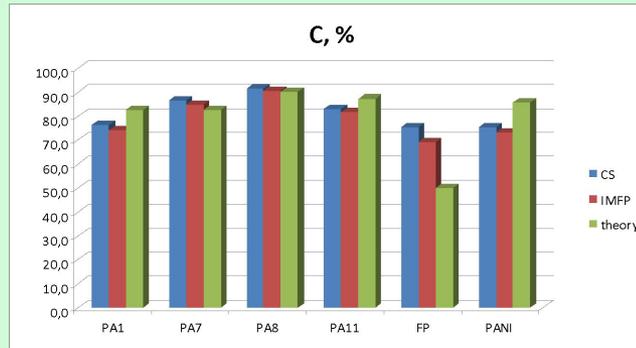
Максимум поглощения при $\lambda = 320$ нм



Химический состав, морфология и заряд поверхностного слоя исследуемых сорбентов



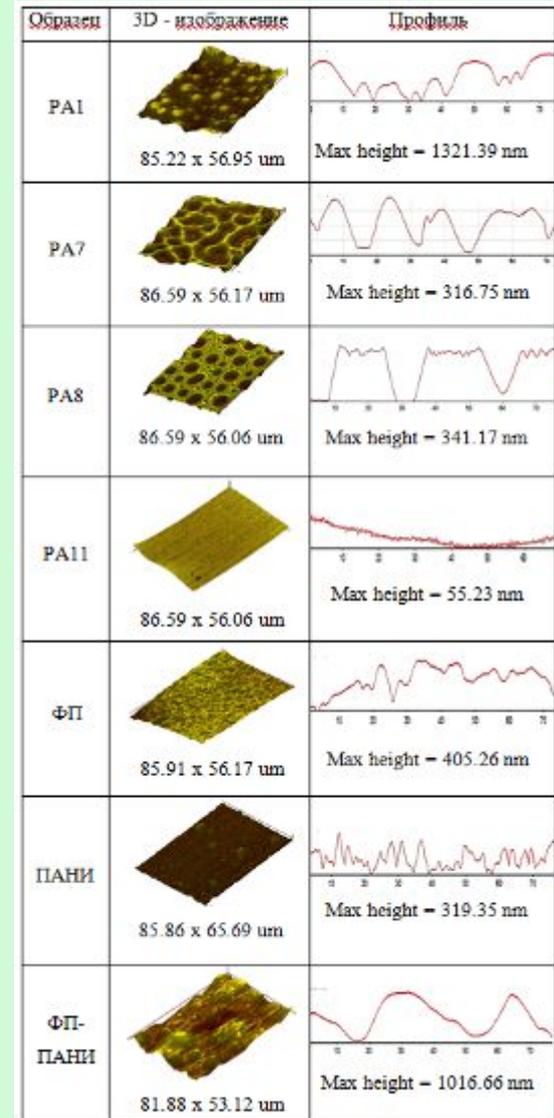
Использованные полимерные модификаторы и их обозначения



Результаты РФЭС. Содержание атомов углерода в использованных полимерных модификаторах, рассчитанное методами CS, IMFP и исходя из формулы полимерного звена

ξ-потенциал поверхности исследованных сорбентов

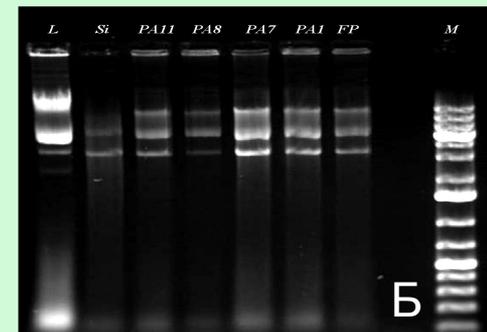
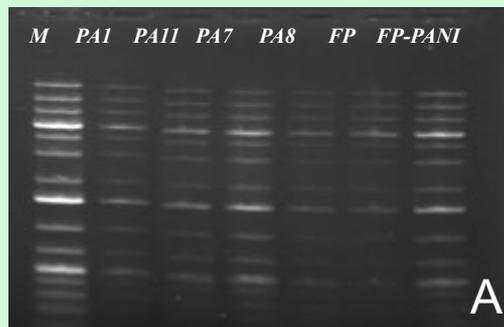
Образец	ξ-потенциал (±SD n = 3), mV
Si-PA1	2.1±0.05
Si-PA7	2.3±0.05
Si-PA8	1.6±0.05
Si-PA11	5.1±0.05
Si-FP	10.2±0.05
Si-PANI	32.0±0.05
PANI	30.5±0.05



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

Использованные биополимеры:

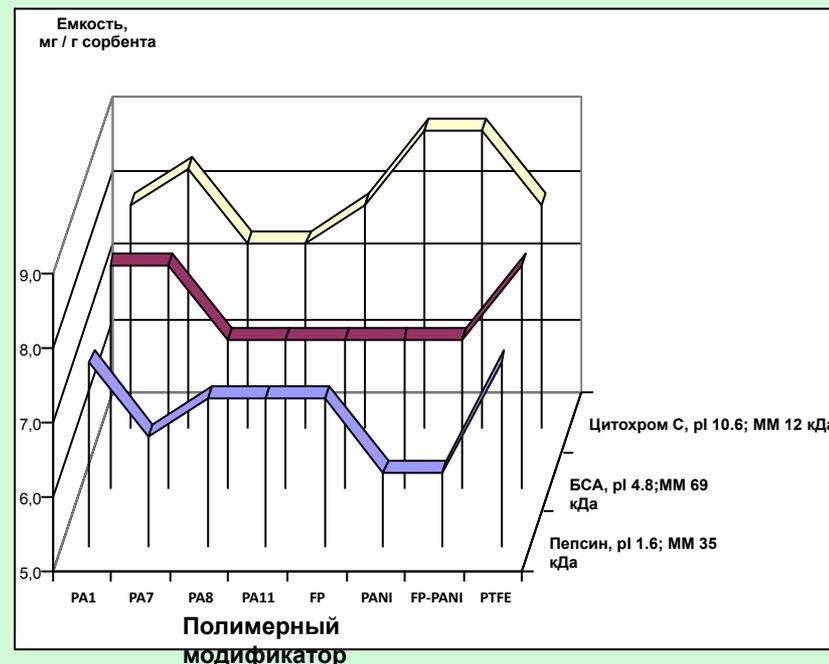
Биополимер	Мм, кДа	pI
Цитохром С	~ 12	10.6
БСА	~ 69	4.8
Пепсин	~ 35	1.6
тРНК из пекарских дрожжей, тип X	~ 25	-
ДНК-линейка: смесь фрагментов от 75 до 20 000 pb	26 – 6 900*	-



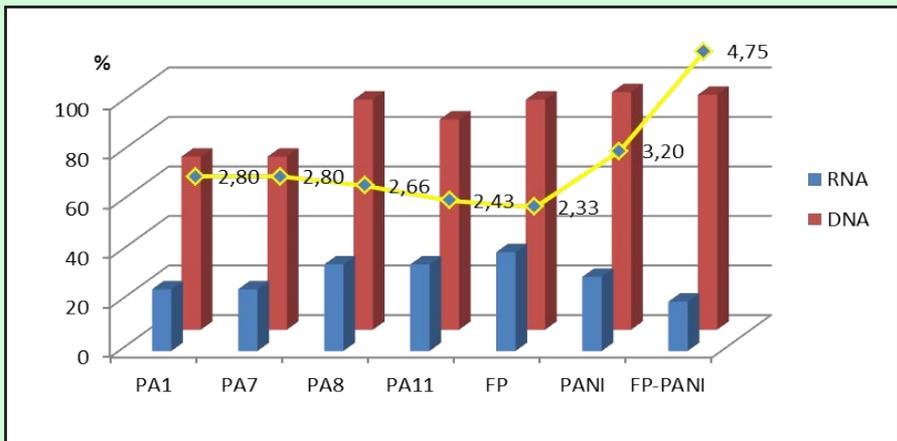
Электрофорез в 0.8% агарозном геле: А - ДНК-фрагментов (1 kb DNA Ladder GeneRuler™ 75 – 20000 bp); Б - ДНК, выделенной из *E.coli*.

Удерживание модельных биополимеров на полученных сорбентах (±SD n = 3)

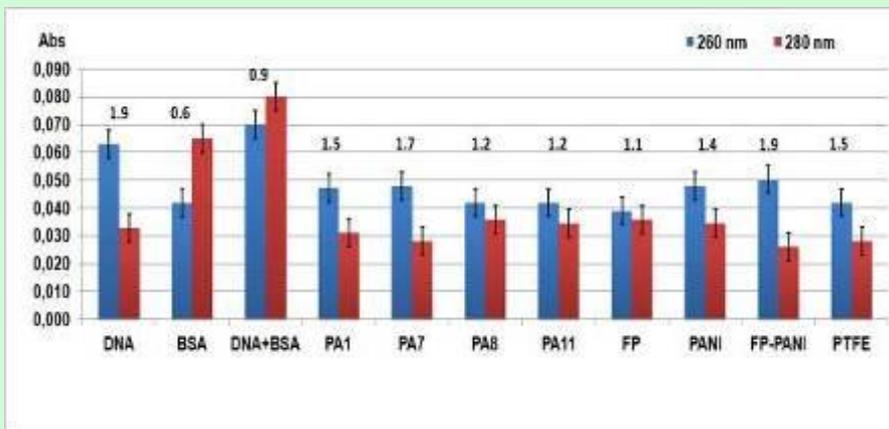
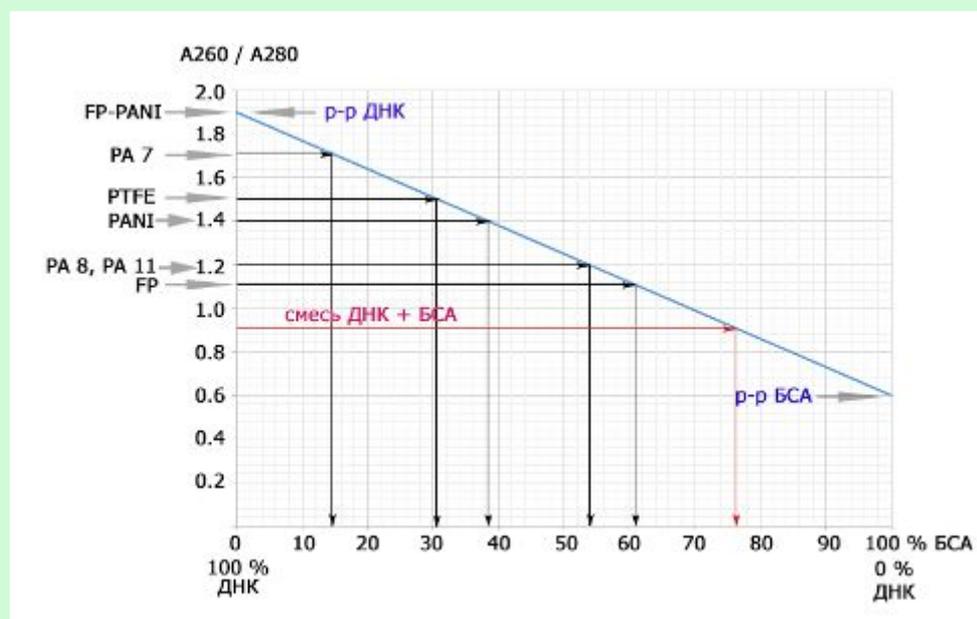
Полимерный модификатор	Выход ДНК, %	Выход РНК, %	Емкость по пепсину, мг/г сорбента	Емкость по БСА, мг/г сорбента	Емкость по цитохрому С, мг/г сорбента
PA1	74±0.56	30±0.33	7.0±0.18	8.0±0.21	8.0±0.21
PA7	75±0.57	30±0.32	6.5±0.15	8.0±0.19	8.5±0.18
PA8	60±0.52	7±0.18	7.0±0.17	7.0±0.16	7.5±0.21
PA11	63±0.51	15±0.24	7.0±0.18	7.0±0.18	7.5±0.19
FP	65±0.42	7±0.18	7.0±0.17	7.0±0.17	8.0±0.20
PANI	71±0.59	4±0.12	6.0±0.12	7.0±0.17	9.0±0.25
FP-PANI	80±0.84	5±0.15	6.0±0.13	7.0±0.16	9.0±0.21
PTFE	67±0.52	2±0.08	7.5±0.19	8.0±0.20	8.0±0.19



Сорбционная емкость исследованных сорбентов по трем различным белкам



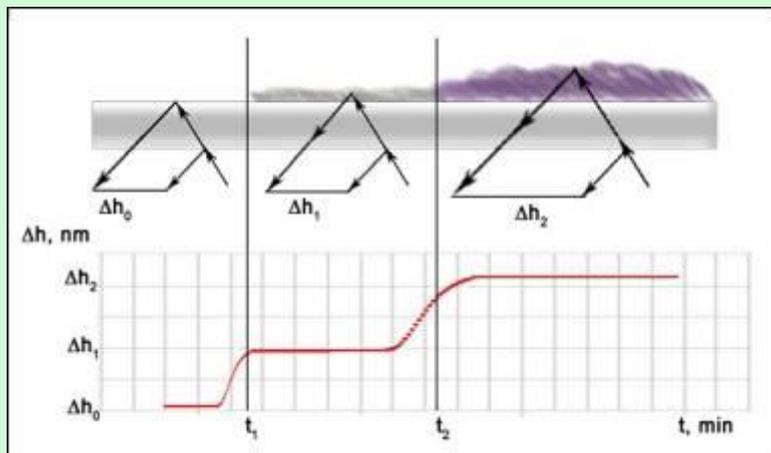
Содержание днДНК и РНК в элюатах, полученных с использованием исследуемых сорбентов



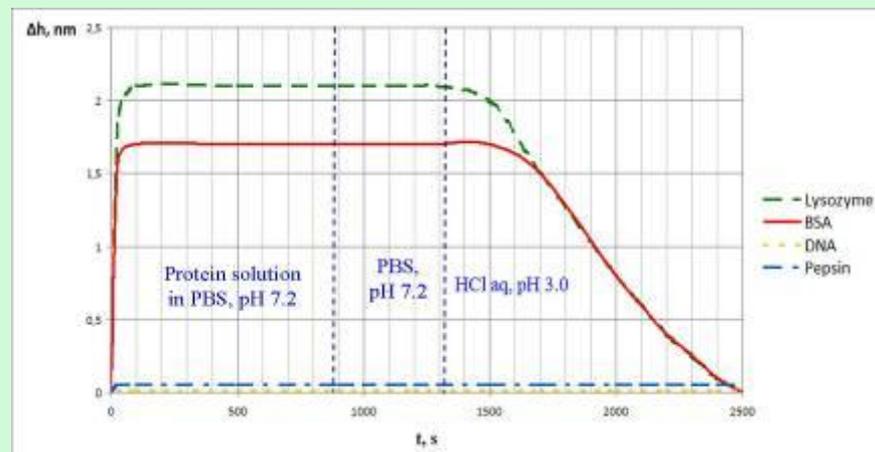
Сравнение степени очистки ДНК от БСА в результате использования модельных сорбентов

	A260/A280	Ratio DNA/BSA, %/%
DNA	1,9	100/0
FP-PANI	1,9	100/0
PA7	1,7	86/14
PTFE	1,5	70/30
PA1	1,5	70/30
PANI	1,4	62/38
PA8	1,2	48/54
PA11	1,2	48/54
FP	1,1	39/61
DNA+BSA	0,9	24/76
BSA	0,6	0/100

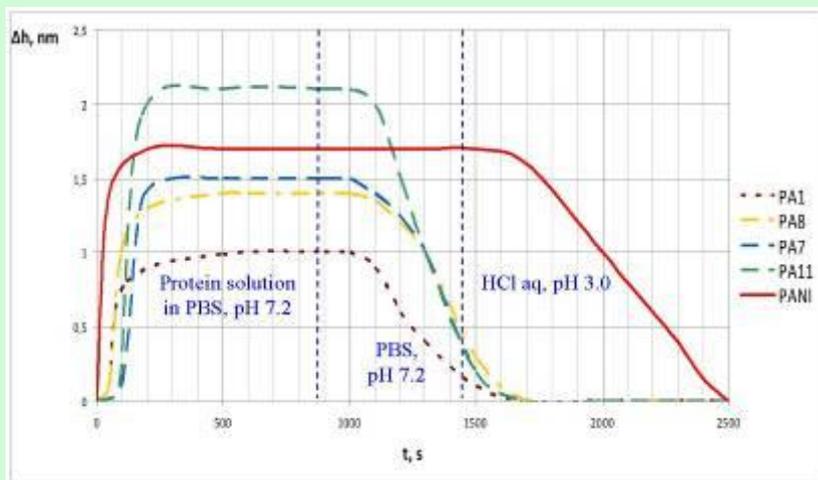
Исследование сорбционных свойств нанопокровтий на основе полианилина и полиарамидов методом спектрально-корреляционной интерферометрии в режиме реального времени



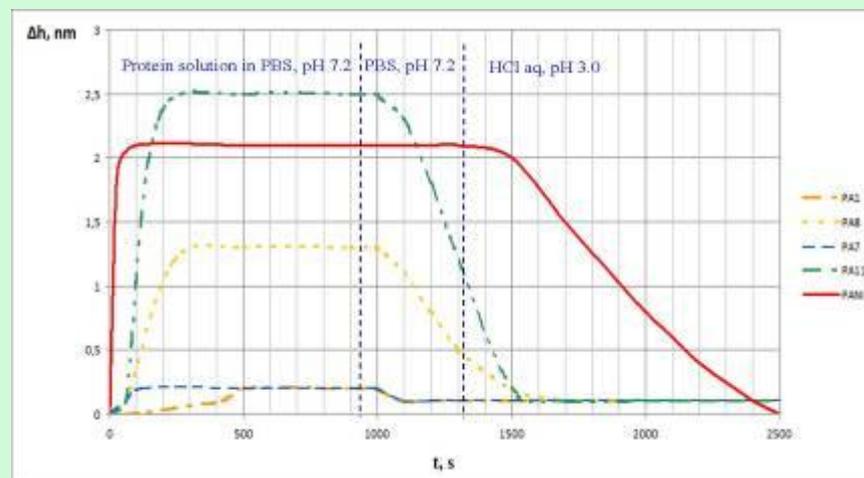
The principle of signal formation in the SCI method.



Dynamics of sorption of biopolymers on the surface of glass slides modified with PANI (flow rate 15 $\mu\text{l}/\text{min}$). Data were expressed as mean \pm SD, $n = 3$.

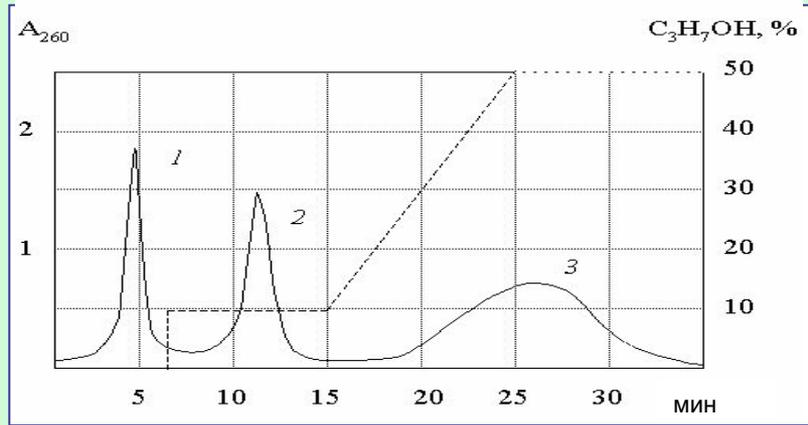


Dynamics of BSA sorption on the surface of glass slides modified with polyaramides PA1, PA7, PA8, PA11 and PANI (flow rate 15 $\mu\text{l}/\text{min}$). Data were expressed as mean \pm SD, $n = 3$.



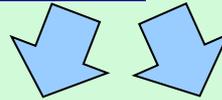
Dynamics of lysozyme sorption on the surface of glass slides modified with polyaramides PA1, PA7, PA8, PA11 and PANI (flow rate 15 $\mu\text{l}/\text{min}$). Data were expressed as mean \pm SD, $n = 3$.

Выделение днднк



Очистка плазмиды pBR322 от РНК и сопутствующих белков на колонке, упакованной носителем Trisorog™-500, модифицированным ПТФЭ (250 x 4.6 мм вн. D) (сорбент получен методом радиационной постполимеризации в присутствии носителя).

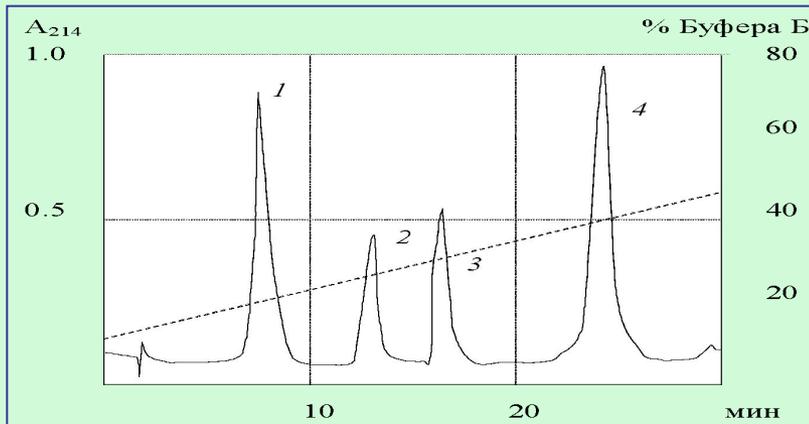
Элюент: 0.01M Tris-HCl (pH 7.5-8.2).
 Градиент: 0-50% пропанола, 20 мин.
 Скорость элюции: 100 мкл/мин.
 (1) Плазмида (2) РНК (3) белки.



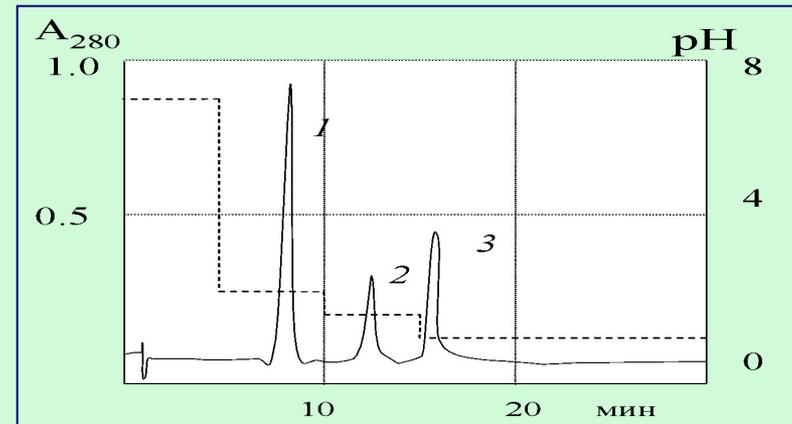
ФТОРПОЛИМЕРЫ: *градиент органического растворителя*

Выделение белков

ПАНИ: pH-градиент



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



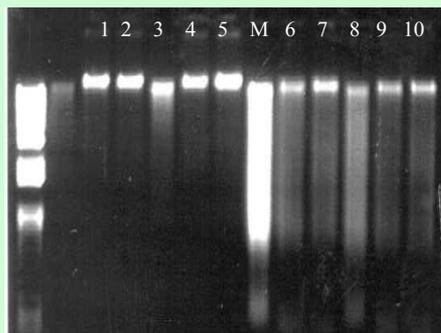
Разделение смеси белков на колонке (150 x 5 мм Двн.), упакованной МПС, модифицированным ПАНИ, в градиенте pH (7.0 – 1.0): скорость элюции: 0.25 мл/мин; раствор А – деионизованная вода; раствор В – 0.015 М водная соляная кислота; градиент: 0 – 55% раствора В в течение 30 мин. 1 – лизоцим (pI = 11, Rt = 10.9); 2 – миоглобин pI = 7, Rt = 12.5); 3 – цитохром С (pI = 5.6, Rt = 14.3).

ОДНОСТАДИЙНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК

Материал

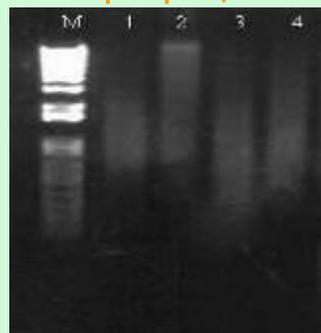
Примеры

Выделение ДНК
картриджным методом



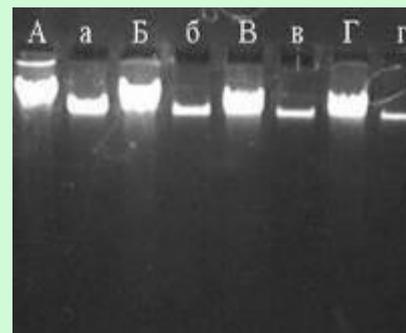
ПФБД-сорбент
ПФБД-сорбент (1 – 5)
Qia Amp kit (Qiagen) (6 – 10):
1,6 - *E.coli*;
2,7 – *Proteus vulgaris*;
3,8 – *Salmonella typhimurium*;
4,9 – *Bacillus subtilis*;
5, 10 – *Staphilococcus aureus*.

Выделение фрагментов
ДНК на картриджах
после рестрикции



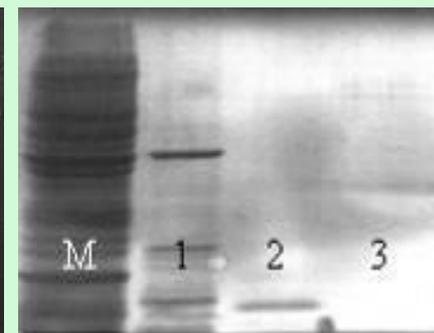
ДНК из *E.coli* после
обработки
рестриктазами:
2, 4 - *Eco RI*;
3, 5 – *Hinf*.
2, 4 – картриджный
метод; 3, 5 – *batch-*
метод.

Сравнение ПФБД-сорбента и не
содержащего фторполимер
материала при выделении ДНК



ПФБД-сорбент (А-Г),
А/а – *Escherichia coli*;
Б/б – *Bacillus subtilis*;
В/в – *Listeria*
monocytogenes;
Г/г – *Staphylococcus*
aureus.
а-г – **Qia Amp kit**
(Qiagen)

Степень очистки от белков.
Картриджный (3) и *batch-* (2) методы:



ПААГ-электрофорез
элюатов:
1 – культура *E.coli*,
2 – *Batch-*метод,
3 – картридж.

ПЦР. Сравнение картриджного и *batch-*методов



Источник ДНК - *E.coli*.
Картриджи с ПФБД-сорбентами различной пористости.

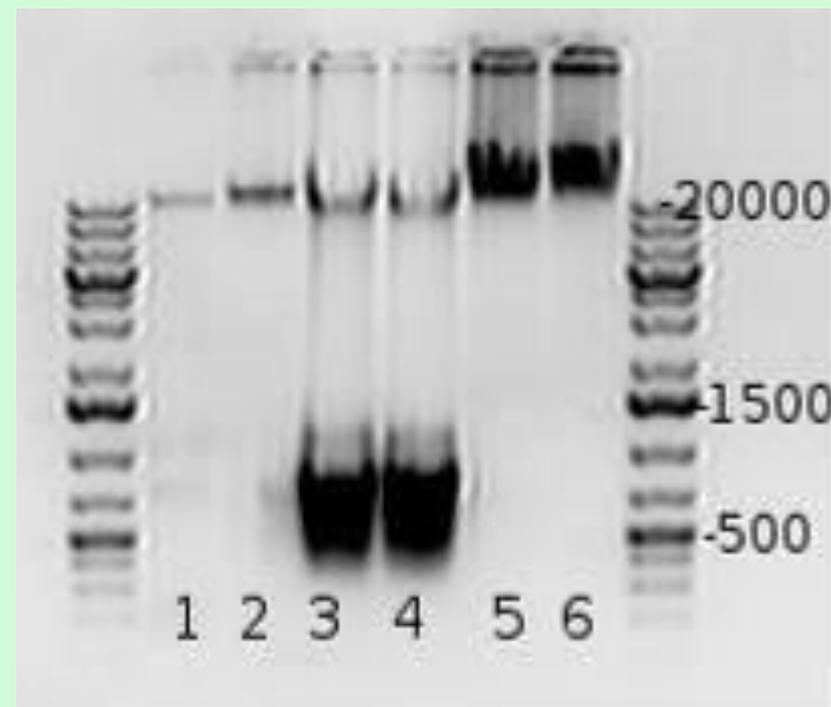
ПАТЕНТЫ:

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. **US 2006243658,**
02.11.2006.

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. **US 20080015341A1, 01.17.2008.**

Источники ДНК: бактериальные лизаты, пищевые продукты (сухое молоко, йогурт).

Материал	Продолжительность хранения выделенной ДНК, дни	
	0	31
МПС- <i>i</i> -ПАСК-ПАНИ	100	0.05 ± 0.006
ФП-ПАНИ-сорбент	100	98 ± 2

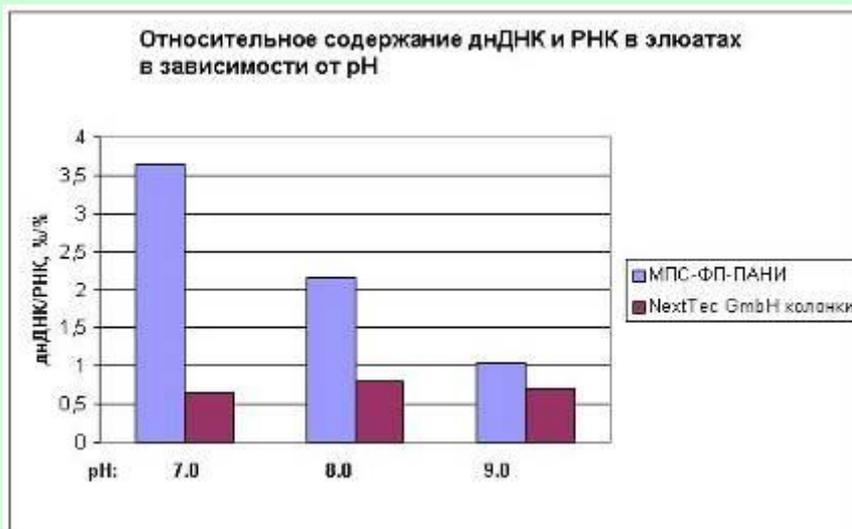


Выделение бактериальной ДНК (10^9 клеток/образец) различными методами:

1 - 2: “Fermentas Ltd” DNA extraction kit;

3 – 4: “ДНК-Технология”, набор «Проба-ГС» (без добавления РНКазы);

5 – 6: Картриджи, упакованные ФП-ПАНИ сорбентом.

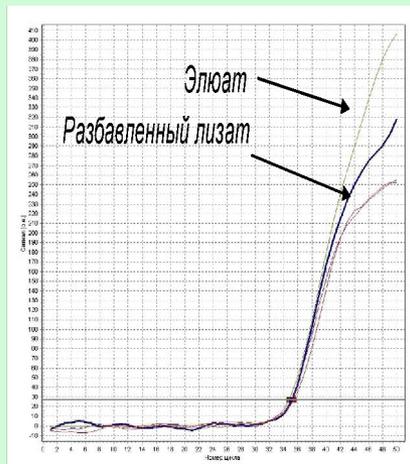
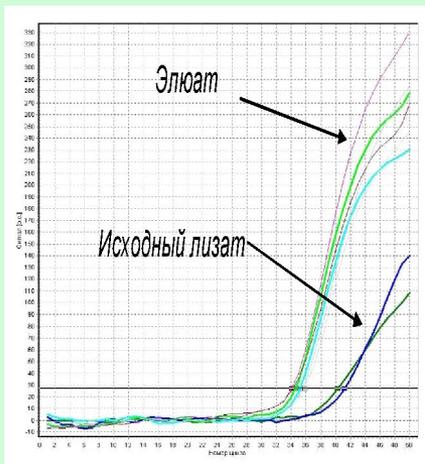


Относительное удерживание днДНК и РНК на ФП-ПАНИ и колонках nexttec™ в зависимости от рН среды

Разработан ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ № ЛР-02072010 НА ОПЫТНО-ЛАБОРАТОРНОЕ ПРОИЗВОДСТВО КОМПОЗИЦИОННОГО СОРБЕНТА Si-500-ФП-ПАНИ

Одностадийное выделение ДНК из *Mycobacterium tuberculosis complex* для ПЦР-диагностики на ФП-ПАНИ-сорбенте

Результаты ПЦР в реальном времени с использованием микобактериальной ДНК, выделенной с помощью ФП-ПАНИ-сорбента из лизатов модельных образцов мокроты, содержащих 600 КОЕ/мл. Стрелка указывает на кривые, полученные при использовании не очищенных образцов (исходные лизаты):



Количество ПЦР-фрагментов микобактериальной ДНК при картриджном и автоматическом выделении ДНК:

Образец	Количество ДНК, копий/объем		
	Картриджи, 10 мкл	Автоматическое выделение, 25 мкл	Автоматическое выделение, после разбавления
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

Значения порогового цикла и рассчитанное количество копий ДНК в исследованных образцах после проведения ПЦР в реальном времени: 1 – 9 – модельные образцы мокроты, содержащие 600 КОЕ/мл после пропускания через картридж, содержащий ФП-ПАНИ-сорбент:

Образец	Пороговый цикл (Ct)	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

Заключение ЗАО «НПФ Синтол»:
 эффективность автоматического многостадийного выделения составила от 0.3 до 7% по сравнению с выделением с использованием ФП-ПАНИ сорбента.

Выделение ДНК (iС ген человека и ДНК фага Т4) из лизатов крови на ФП-ПАНИ-сорбентах

Метод выделения	ДН человека, сред. Ct	Относи. концентрации (RC) ДН в элюате после выделения	Вирусная ДН фаг Т, сред. Ct	Относи. концентрации (RC) ДН в элюате после выделения
Проба Г и 5 мк кров; элюция 1000 мкл	26.5	1	19.4	1
Картриджи выделени и ядер лейкоцитовз (и 25 мк кров)	23.6	7.64	н определяли	-
Картриджи и 50 мк цельно кров л и	24.1	5.28	16.3	9.18



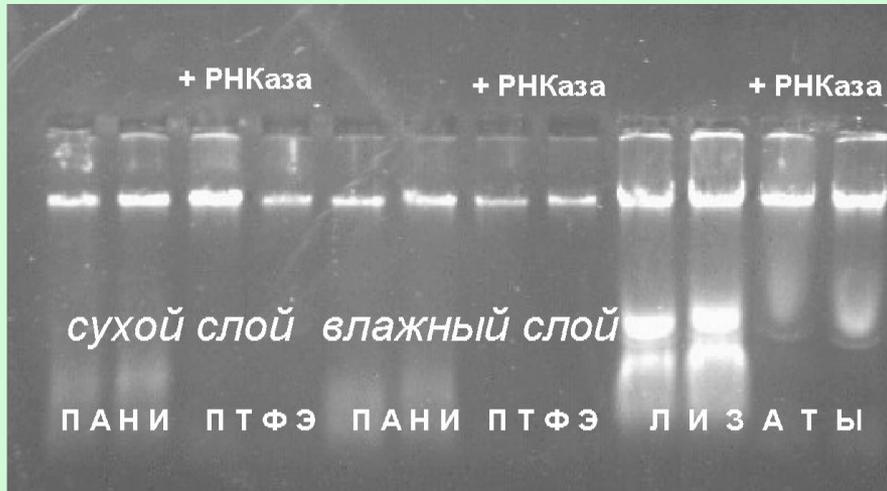
(Ct GS-Ct cartridge)

$$RC = 2$$

Число этапов в пробоподготовке	
Проба ГС	Картриджный метод
20	8

Выделение ДНК из лизатов растительной ткани и из грибов с помощью ПАНИ- и ПТФЭ-содержащих сорбентов

25



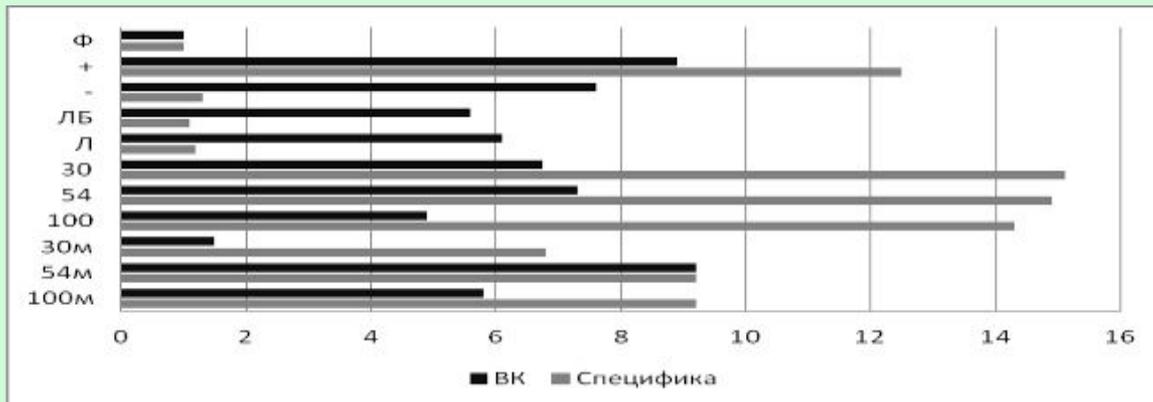
Способы: нанесение на сухой или уравновешенный буфером сорбент; с добавлением РНКазы или без добавления.

Электрофорез в 1% агарозном геле образцов ДНК, полученных при пропускании лизатов листьев табака *Nicotiana Tabacum* L. через картриджи, упакованные ПАНИ- и ПТФЭ-содержащими сорбентами.



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

Результат FLASH-PCR элюатов после выделения ДНК из мицелия фитопатогенного гриба *Fusarium graminearum* и из зараженных семян пшеницы на картриджах с ФП-ПАНИ-сорбентом



По оси абсцисс отложена интенсивность флуоресценции, по оси ординат — номера образцов.

100, 54, 30 – объем лизата (мкл), пропускаемый через картридж; м – образец ДНК, выделенный из мицелия гриба; «Л» – неочищенный лизат; «ЛБ» - лизирующий буфер, «-» - вода, «+» – положительный контроль; «Ф» - фон.

Черный столбец — внутренний контроль, серый столбец — специфика.

Зонд и праймеры на ген *tef1a* *F. graminearum*

(разработаны в группе Молекулярной диагностики ИБХ РАН):

PrFgr FAM 5'-CGCGCCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGCG-5'- BHQ2

FgrF 5'-CCCAACCCCGCCGACACT-3'

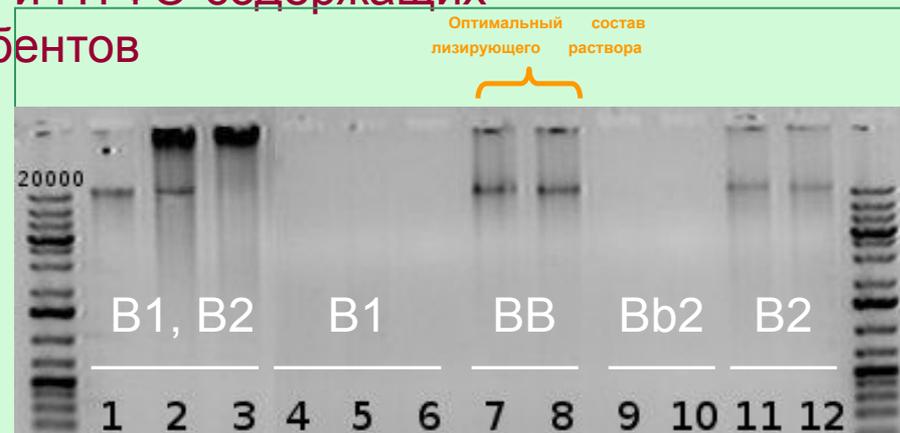
FgrR 5'-GGTTTGTGGGAAGAGGGCAGA-3'

Выделение ДНК из крови животных и человека с помощью ПАНИ- и ПТФЭ-содержащих сорбентов



Способы: нанесение на сухой или уравновешенный буфером сорбент.

Электрофорез в 1% агарозном геле образцов ДНК, полученных при пропускании лизатов крови коровы (К) и свиньи (С) через картриджи, упакованные ПАНИ- и ПТФЭ-содержащими сорбентами.



Выделение из ядер лейкоцитов:
1 – Проба ГС;
2 – ФП-ПАНИ-сорбент;
3 - nexttec™

4 – 12: выделение из цельной крови, ФП-ПАНИ-сорбент

Тестируемые растворы	Число компонентов
B1	4
BB	5
Bb2	5
B2	4

Использованные буферные растворы содержат различные количества ферментов и ПАВ

Выделение вирусной ДНК из крови на ФП-ПАНИ-сорбенте

27

Результаты испытаний картриджей, содержащих по 100 мг ФП-ПАНИ-сорбента при ОДНОСТАДИЙНОМ ВЫДЕЛЕНИИ ДНК ВИРУСА ГЕПАТИТА В ЧЕЛОВЕКА (HBV) ИЗ КРОВИ

Группа	Источник сыворотки	Количество образцов	Система выделения		
			«Авиценна»	«АмплиСенс-HBV»	ФП-ПАНИ-сорбент
1	Пациенты с хроническим HBV	11	11 +	не определяли	11 +
2	Доноры с высокой концентрацией HBV ДНК	10	10 +	10 +	10 +
3	Доноры с низкой концентрацией HBV ДНК	12	12 +	12 -	12 +
4	Возвратные доноры	2	2 -	2 -	2 -
5	Здоровые доноры	3	3 -	3 -	3 -
Чувствительность системы (копий-эквивалентов/мл)			300	1000	≤ 300
Время на пробоподготовку (после лизиса), мин			20	30	3 - 5

HBV - днДНК

TTV – циклическая онДНК
 Воспроизводимость результатов достигается при увеличении числа циклов ПЦР

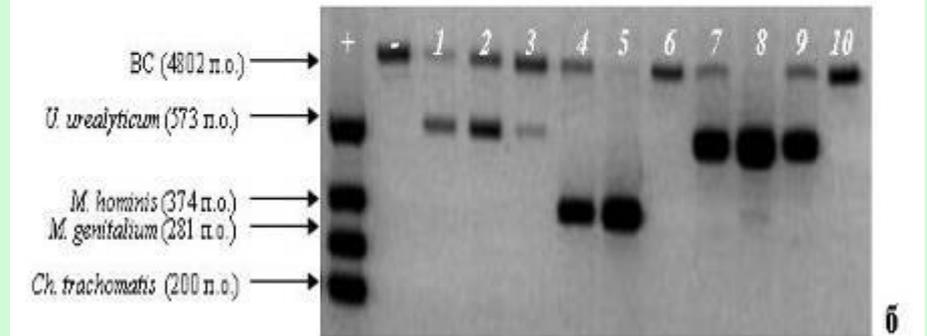
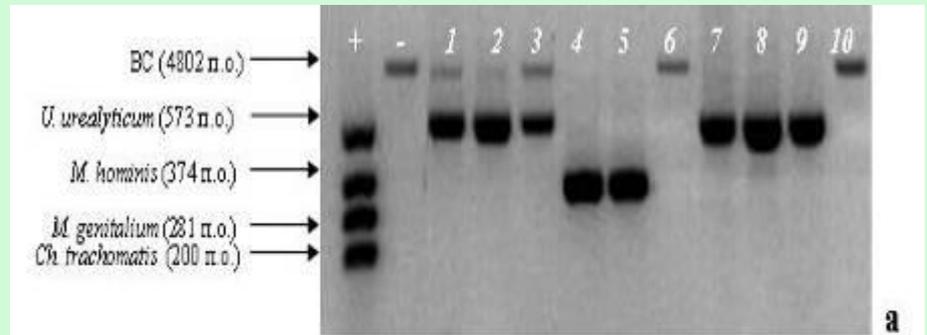
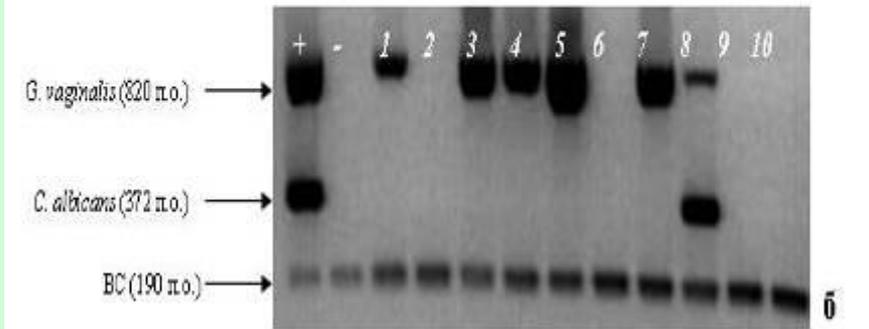
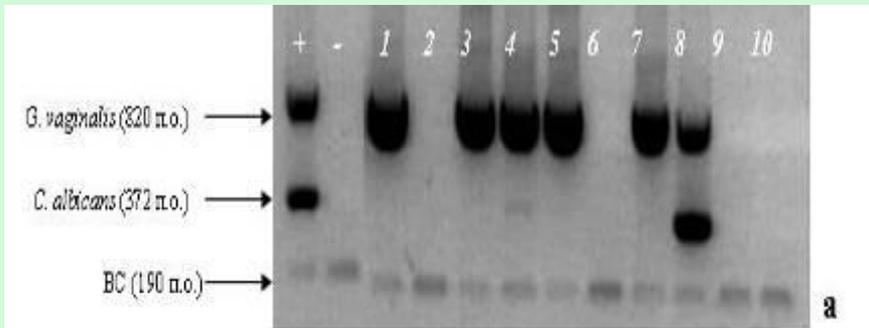


ПЦР-диагностика возбудителей урогенитальных инфекций человека после выделения ДНК с помощью:

28

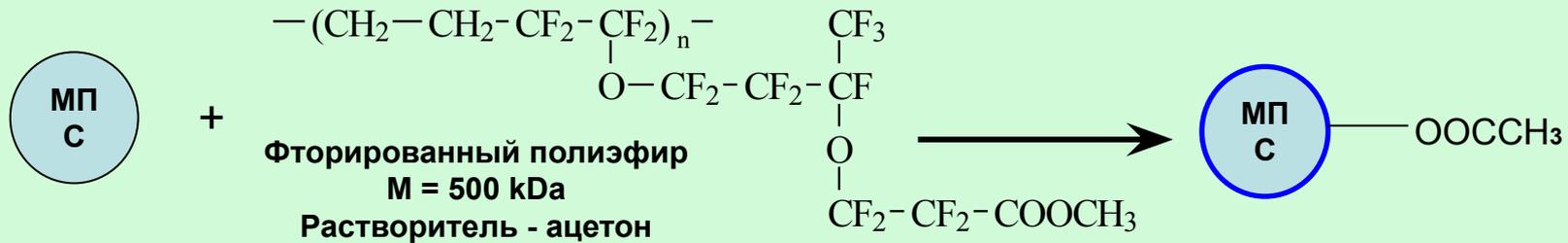
- (а) - коммерческого набора Диатом™ ДНК Преп 100 («ИзоГен», Россия)
- (б) - ПАНИ-сорбента (на озонированном кремнеземе)

Электрофорез в 2% агарозном геле, выделение из урогенитальных мазков



Получение фторполимер-модифицированного носителя для твердофазного синтеза олигонуклеотидов

Иммобилизация фторсодержащего полимера на поверхность пористого кремнезема из раствора ("casting")

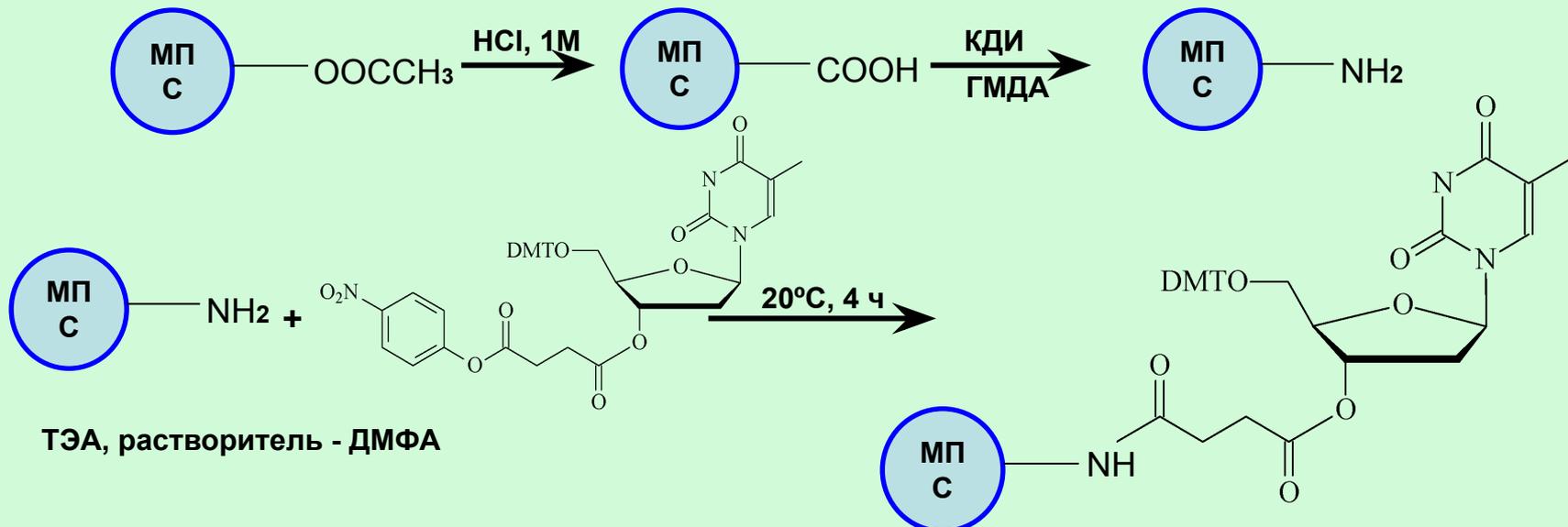


Вакуумирование навески кремнезема и введение раствора полимера →

Ультразвуковая обработка суспензии и удаление растворителя →

Отмывка и сушка готового продукта

Последующая химическая модификация полимерного покрытия и иммобилизация нуклеозида



Характеристики олигонуклеотидов, синтезированных на фторполимермодифицированных матрицах

Характеристики носителя				Результат анализа	
Образец	Загрузка (мкмоль/г)	Модификатор	Изготовитель	ВЭЖХ, чистота, %	Выход с колонки (100 мг), ОЕ
1	37	PFOB $\text{-(CF}_2\text{-CF}_2\text{)}_n\text{-(CH}_2\text{-CH)}_m\text{-}$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{CH}_2\text{-NH}_2$	ИБХ	52.4	29.3
2	39	EVE $\text{-(CF}_2\text{-CF}_2\text{)}_n\text{-(CH}_2\text{-CH)}_m\text{-}$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad \text{CH}_2\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_4\text{-COOH}$	ИБХ	57.3	30.0
3	12	-	(ЗАО «Синтол», Россия)	40.4	5.9

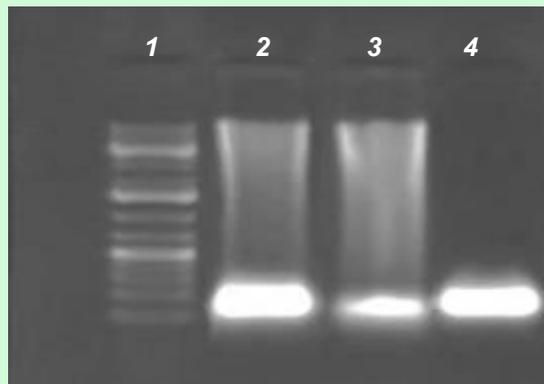
Содержание доступных нуклеозидных остатков в материале, модифицированном EVE:
 для свежеприготовленного носителя - **9.33** мкмоль/г;
 через 9 месяцев хранения при комнатной температуре - **9.25** мкмоль/г.

СОРБЕНТЫ НА НЕКРЕМНЕЗЕМНЫХ НОСИТЕЛЯХ

Модифицирование мультикапиллярных систем (МК) и синтетических мембран нанослоями полимеров для экстракции/очистки ДНК



Совместно с ООО НПП «Наноструктурная технология стекла» (г. Саратов) и ООО «ТестГен» (г. Димитровград)



1 – ДНК-маркер;
2 – Исходная смесь ДНК-белок;
3 – Элюат из носика без инкубирования;
4 – Элюат из носика после промывания и инкубации (3 мин).
Электрофорез проводили в 0.8% агарозном геле.



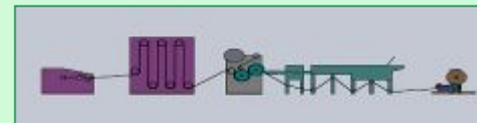
Совместно НПП «Технофильтр» (г. Владимир)



Лабораторная установка (15 МК/ч)

Преимущества:

- сокращение числа стадий при выделении /очистке ДНК;
- существенная экономия реактивов и времени на выделение/очистку



Промышленная технологическая линия (15 м²/ч)

Примеры ПАНИ-модифицированных полимерных пористых монолитов



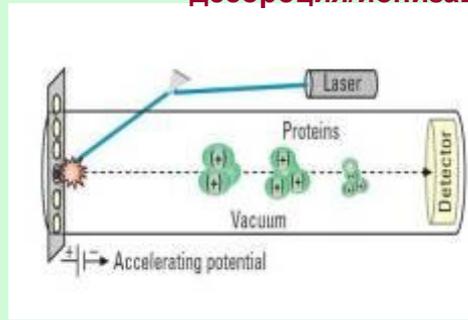
Получение анилинсодержащих композитов для биоаналитики

Модификация кремниевых чипов сополимерами анилина с *m*-аминобензойной кислотой (*m*-АБК) обеспечивает

эффективную пробоподготовку для SELDI-TOF-MS анализа белков и пептидов

32

Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация (MALDI) и активированная поверхностью лазерная десорбция/ионизация (SELDI)



Название	Английское название	Растворители для матрицы	Типы исследуемых веществ
2,5-Дигидроксибензойная кислота	2,5-Dihydroxybenzoic Acid (DHB)	Вода, этанол, метанол, ацетон, ацетонитрил, хлороформ, тетрагидрофуран	Пептиды, олигонулеотиды, полисахариды, синтетические полимеры
2-(4-Гидроксифенилазо)-бензойная кислота	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoic acid (HABA)	Диоксан, ацетон, тетрагидрофуран, диметилформамид	Пептиды, белки, синтетические полимеры
α-Циано-4-Гидроксикоричная кислота	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid	Ацетон, вода, ацетонитрил, ТГФ, ДМФА, этанол	Пептиды, синтетические полимеры

MALDI: «матрицу» добавляют к пробе

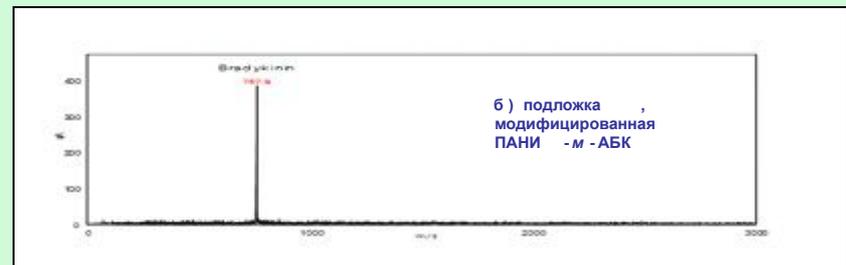
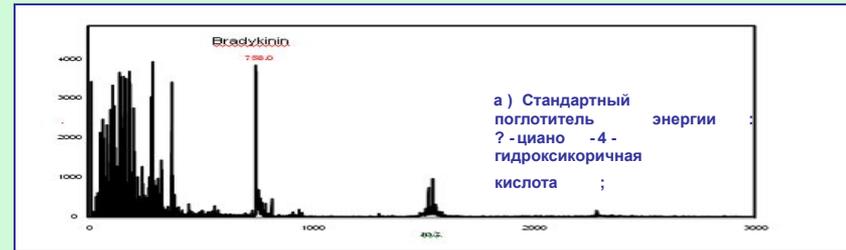
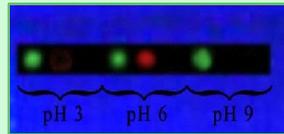
SELDI: каплю пробы наносят на пластину, модифицированную слоем «матрицы»

Определение брадикинина методом SELDI-TOF MS на кремниевых пластинах, модифицированных ПАНИ-*m*-АБК

Адсорбция различных белков на кремниевых пластинах, модифицированных ПАНИ-*m*-АБК

Белок	pI	Цвет
Цитохром С	10.3	Зеленый
Миоглобин	6.9	Красный
Пепсин	2.8	Желтый

	Цитохром С	Миоглобин	Пепсин
Перед отмывкой	+	+	+
pH 3	+	+/-	-
pH 6	+	+	-
pH 9	+	-	-



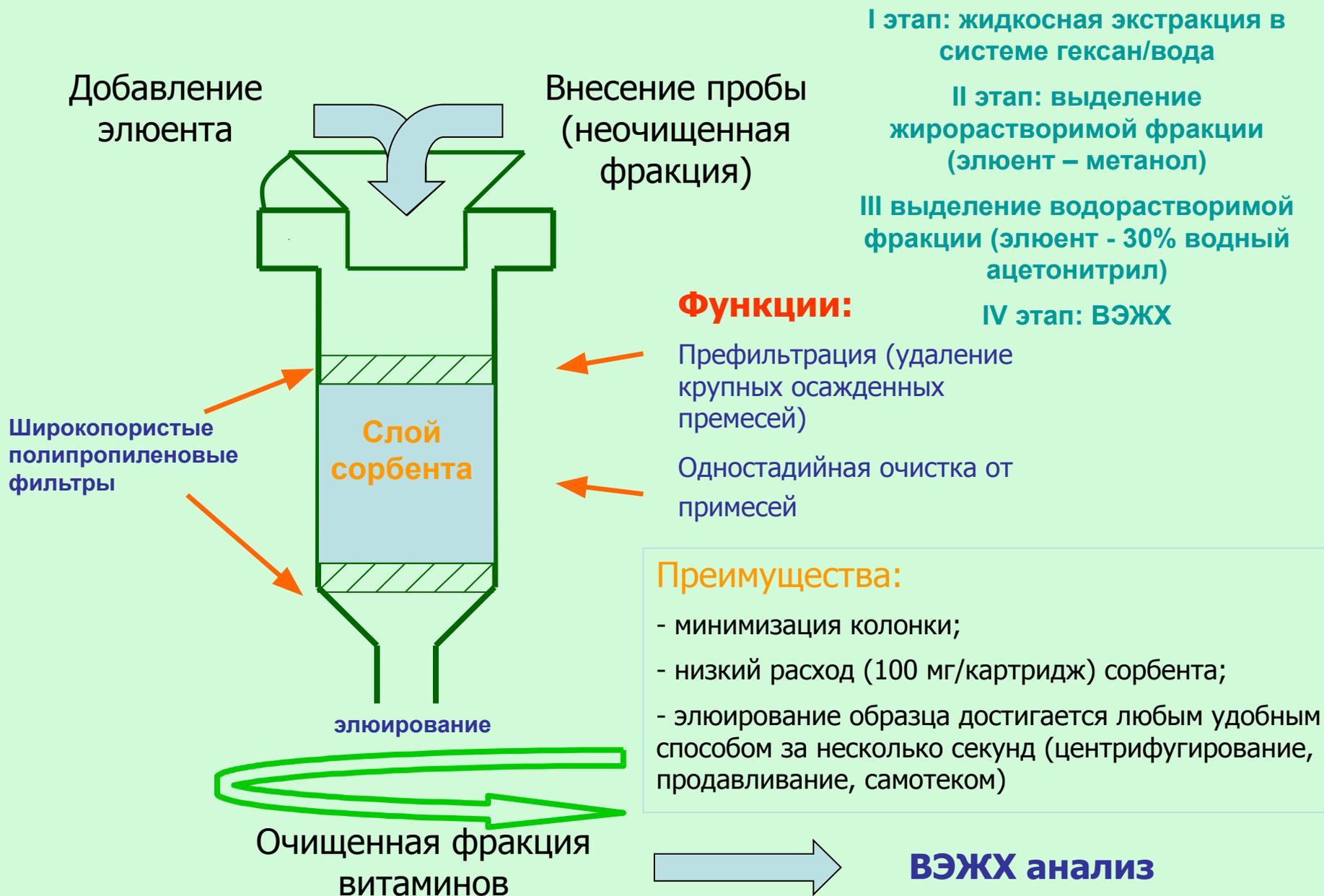
ПАТЕНТ: Vaccine-Shlosser G., Ribbing C., Bachman P.K., Zubov V.P., Kapustin D.V. Surface coating for laser desorption ionization mass spectrometry of molecules. 2011. Patent WO 2011004308 (A1).

Nanocomposites and Polymers with Analytical Methods, ISBN: 978-953-307-352-1. Dmitry Kapustin, Anna Prostyakova, Yana Bryk, Elena Yagudaeva and Vitaly Zubov. Chapter 4. New Composite Materials Modified with Nano-Layers of Functionalized Polymers for Bioanalysis and Medical Diagnostics.

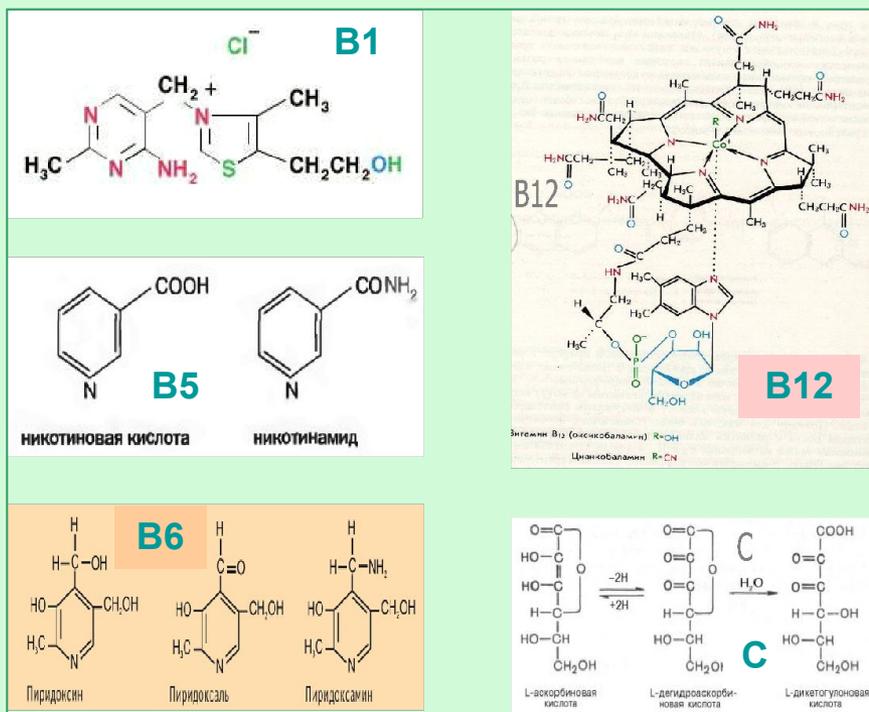
Проект 6-ой рамочной программы Евросоюза NACBO («Новые и усовершенствованные наноматериалы, химические методы и оборудование для нанобиотехнологии», NMP4-CT-2004-500804: 2004 – 2010 г.г.)

Применение ФП-сорбента для выделения витаминов

Картриджный метод выделения фракций водо- и жирорастворимых витаминов для последующего ВЭЖХ анализа 33



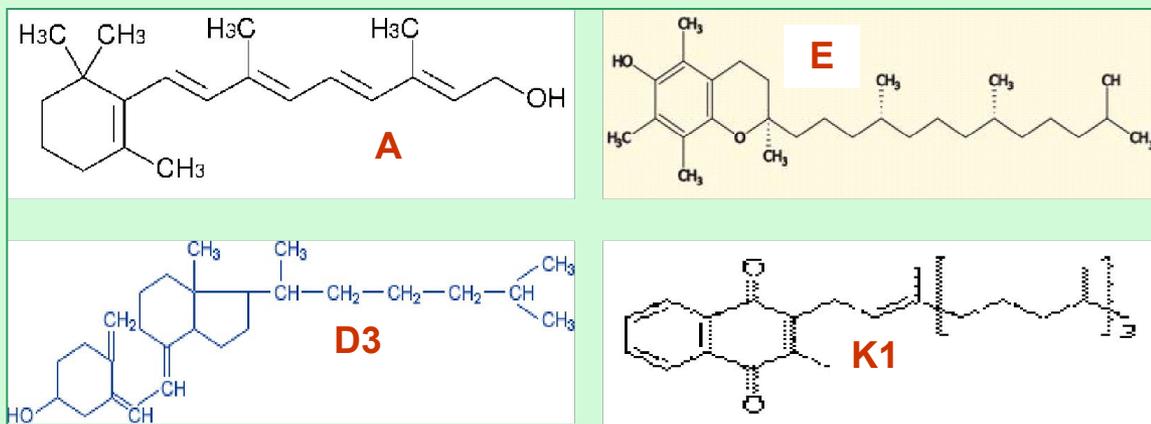
водорастворимые:



Времена удерживания пиков (минуты) и примерные пределы обнаружения (ПО, мкг/мл)

	Водорастворимые витамины		Жирорастворимые витамины		
	Время	ПО	Время	ПО	
C	1.708	1	A	7.93	0.01
B₁	9.88	0.1	D₃	9.05	0.001
B₅	10.54	0.1	E	9.43	0.1
B₆	9.23	0.01	K	10.47	0.01
B₁₂	18.05	0.01			

жирорастворимые:



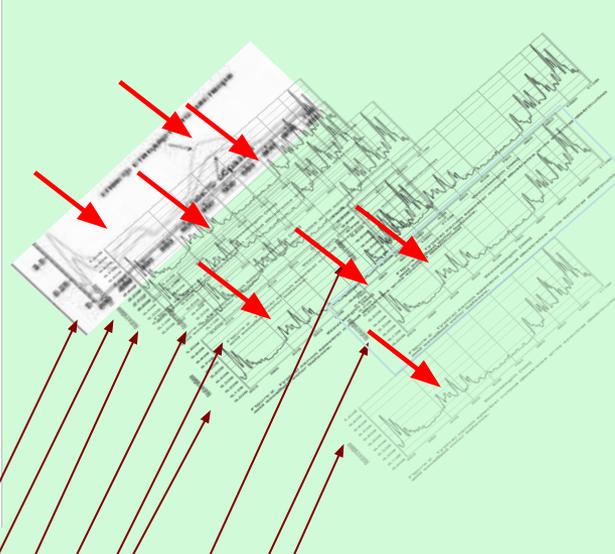
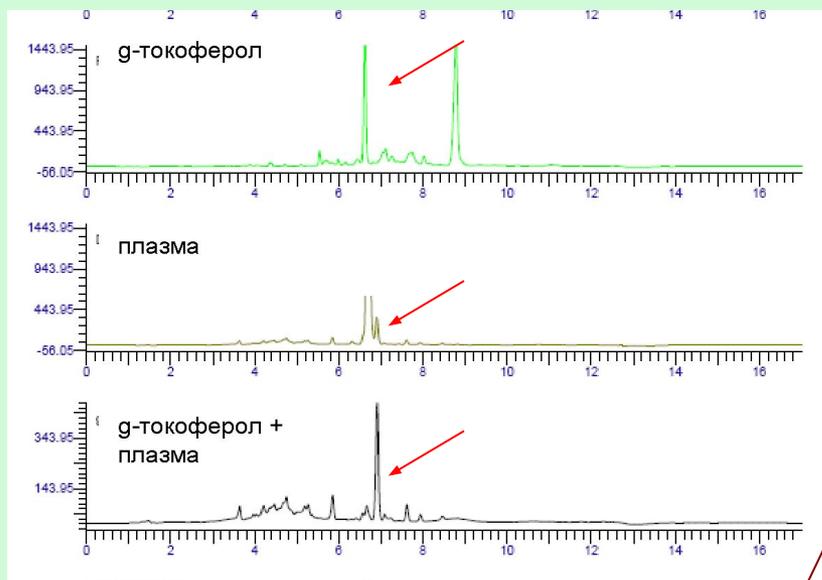
Зайцева И.П., Серебрянский Е.П., Скальная М.Г., Капустин Д.В.

Аминокислотный и витаминный профили сыворотки крови студенток ВУЗа, занимающихся спортом.

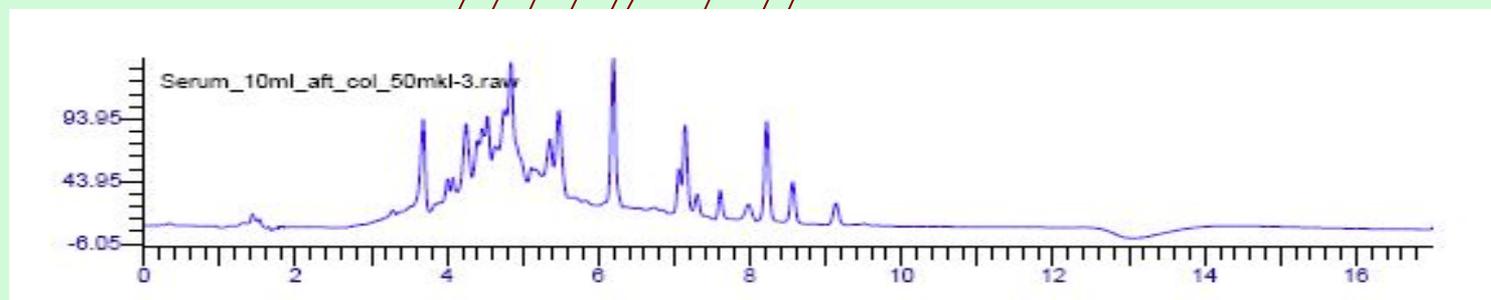
"Вестник восстановительной медицины", №6, 2014.

Иллюстрация принципа соответствия пика на хроматограмме анализируемого компонента максимуму поглощения индивидуального компонента

Калибровка **по времени удерживания** определяемых компонентов с использованием различных стандартов на примере жирорастворимых витаминов



Каждому пику на хроматограмме (пики различаются по времени удерживания компонента смеси) соответствует характеристический пик в спектре поглощения



Области применения разработанных фтополимер- и ПАНИ-содержащих материалов

Область применения	Материал (полимерный модификатор)				
	<i>Перфторполимеры (ПТФЭ и др.)</i>	<i>Частично фторированные полимеры</i>	<i>ПАНИ</i>	<i>Анилинсодержащие полимеры (поликомплексы и сополимеры)</i>	<i>Сочетание фторполимера и ПАНИ</i>
Основные применения					
Одностадийное разделение нуклеиновых кислот и белков	+	+	+	+	+
Одностадийное выделение нуклеиновых кислот из сложных смесей	+	+	+	+	+
Специальные задачи					
Разделение смесей белков	+	-	+	+	+
Иммобилизация биологандов	-	+	-	+	+
Биоаналитические применения	-	-	+	+	+
Одностадийное разделение одно- и двухцепочечных нуклеиновых кислот	-	-	-	+	+
Выделение витаминов из крови	-	+	-	-	-

**АВТОРЫ ВЫРАЖАЮТ ИСКРЕННЮЮ БЛАГОДАРНОСТЬ ОРГАНИЗАЦИЯМ И СОТРУДНИКАМ,
принимавшим участие в работе:**

<p>ФГБУН ИБХ РАН: Лаборатория «Полимеры для биологии», Группа «Молекулярной диагностики», Учебно-научный центр ИБХ РАН, Филиал ИБХ РАН, г. Пущино</p>	<p>Д.б.н. проф. чл.-корр. РАН С.К. Завриев, к.х.н. В.В. Сабуров, к.х.н. Е.Ю. Ягудаева, к.б.н. Л.Л. Завада, д.х.н., к.б.н. Л.С. Жигис, к.б.н. Е.М. Раппопорт, к.б.н. Д.Ю. Рязанцев, к.х.н. А.Н. Генералова, к.х.н. А.А. Вихров, к.х.н. С.В. Сизова</p>
<p>Московский технологический университет (МИТХТ: кафедра ВМС, кафедра аналитики)</p>	<p>Д.х.н. проф. Тверской В.Б., д.х.н., проф. Ищенко А.А.</p>
<p>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»</p>	<p>Н.Н. Пономарев</p>
<p>Институт проблем химической физики РАН (г. Черноголовка)</p>	<p>Д.х.н. М.Р. Муйдинов</p>
<p>ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства (ГНУ ВИЖ), г. Подольск</p>	<p>Д.б.н., чл.-корр. РАН Н.А. Зиновьева</p>
<p>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино</p>	<p>Д.б.н. А.С. Солонин, к.б.н. М.В. Захарова, к.б.н. Т.В. Юркова</p>
<p>НИИ «Химтех», г. Ереван, Армения</p>	<p>† Д.х.н. Г. Балаян</p>
<p>ООО НПП «Технофильтр», г. Владимир</p>	<p>К.х.н., чл.-корр. РАЕН А.В. Тарасов, к.х.н., чл.-корр. РАЕН Ю.А. Федотов</p>
<p>ООО «Амбер», г. С.-Петербург</p>	<p>К.х.н. В.А. Старцев</p>
<p>ООО «НПФ Генлаб», г. Москва</p>	<p>К.б.н. Н.И. Воронцова</p>
<p>ООО НПП «Наноструктурная технология стекла», г. Саратов</p>	<p>† Д.х.н. В.И. Белоглазов, к.х.н. Ю.С. Скибина</p>
<p>National Taiwan University of Science and Technology, Taipei, Taiwan</p>	<p>Dr. Prof. D.-J. Liaw</p>
<p>Nanobiotechnology Research Group, School of Biosciences, University of Kent, Canterbury, Kent, UK</p>	<p>Dr. Prof. I. Bruce</p>
<p>Agrobiogen GmbH</p>	<p>Dr. Prof. G. Brem, Dr. Lutz Plobner, Dr. Prof. R.-M. Leiser</p>
<p>Proligo Biochemie GmbH, Hamburg, Germany</p>	<p>Dr. A. Walter, Dr. M. Lueck</p>
<p>Philips Research Aachen, Germany</p>	<p>Dr. P. Bachmann, Dr. C. Ribbing</p>

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!

Предлагаемые механизмы сорбции:

1. Образование катионных мостиков между силанольными группами на поверхности кремнезема и фосфатными группами ДНК.
2. Молекулы хаотропной соли разрушают водородные связи, присоединяя воду. Молекула ДНК, лишённая гидратной оболочки, становится гидрофобной. То же самое происходит с поверхностью кремнезема. В итоге происходит сорбция ДНК на кремнеземе.

Оптимальные условия для сорбции НК:

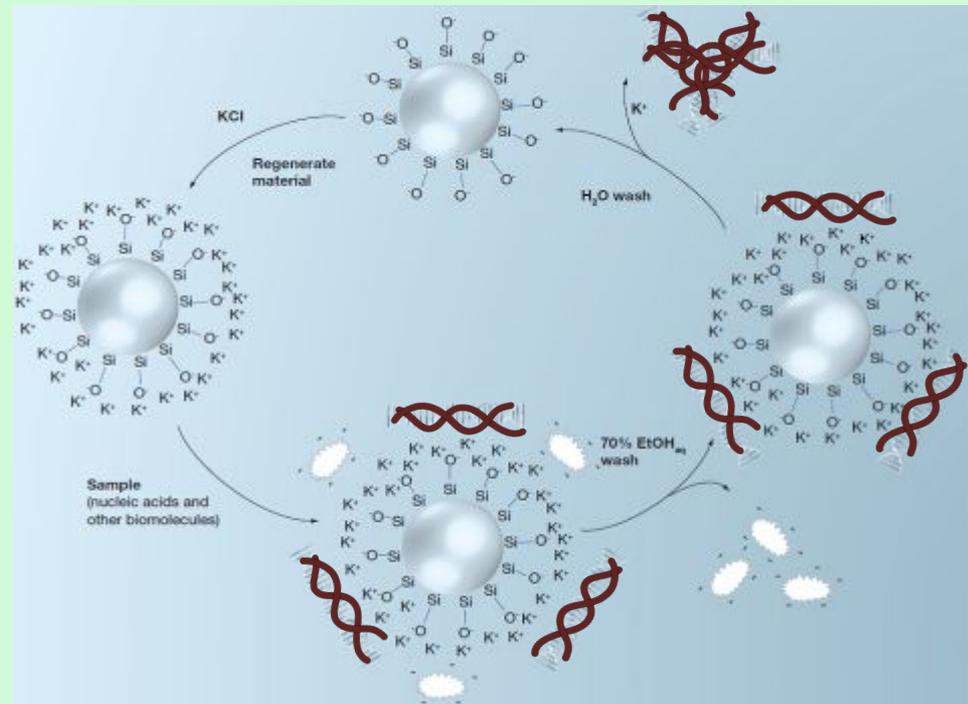
-высокая ионная сила раствора,

-pH 3.5 - 6.5 (оптимум pH 5),

- $t^{\circ} > 37^{\circ}\text{C}$.

ДНК лучше элюируется при pH 8-9,

РНК при pH 6-7.



Белки в данных условиях удаляются с сорбента, например, 70% этанолом

Dag Rother, Tapas Sen, Daniel East & Ian James Bruce. Silicon, silica and its surface patterning/activation with alkoxy- and amino-silanes for nanomedical applications. Nanomedicine (2011) 6(2), 282.

Сходные механизмы имеют место на других носителях (гидроксиапатиты, стеклянные капилляры, кремниевые пластины и пр.