

УДК 577.113:543.4:543.55

**Е. В. Дмитриенко<sup>1,2</sup>, И. А. Пышная<sup>1,2</sup>, Д. В. Пышный<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
пр. Акад. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет  
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

E-mail: elena.dmitrienko@niboch.nsc.ru

### **СОВРЕМЕННЫЕ БИОСЕНСОРНЫЕ ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НУКЛЕОТИДНЫХ МАРКЕРОВ \***

При решении фундаментальных и практических задач современной науки в области молекулярной биологии, биотехнологии и молекулярной диагностики особое внимание уделяют исследованиям, направленным на создание простых в экспериментальном отношении, недорогих, чувствительных и селективных методов анализа, обеспечивающих быстрое выявление в образце биомолекулярных маркеров [1; 2]. Биосенсорные устройства (БСУ) – аналитические системы, сочетающие в себе перечисленные качества. В основе действия биосенсоров (БС) лежит процесс высокоспецифичного распознавания анализируемых молекул [3]. Роль БС состоит в обеспечении платформы, позволяющей перевести факт обнаружения аналита (образования комплекса нуклеотидный зонд / мишень, антиген / антитело, лиганд / рецептор и др.) в аппаратно или визуально регистрируемый сигнал [4]. Одним из самых известных примеров БСУ являются биочипы [5; 6]. Разработка БСУ требует согласования многих факторов, важное место среди которых отведено обеспечению эффективности реализации специфичного взаимодействия между распознающим элементом биосенсора и анализируемой молекулой. Для достоверной регистрации сигнала БС

должны обладать высокой чувствительностью и специфичностью к определяемому компоненту и возможностью регенерации, позволяющей повторное использование сенсора без существенной потери его эффективности. При этом чувствительность сенсора главным образом зависит от способа детекции формируемого комплекса, а специфичность определяется природой взаимодействия иммобилизованных на БС молекул с аналитом и способом детекции реализующегося взаимодействия.

Разработка БСУ – актуальное направление фундаментальных и прикладных исследований. В литературе представлено огромное разнообразие подходов к анализу таких биомолекул, как нуклеиновые кислоты и белки с использованием различных подложек и способов визуализации аналитического сигнала. Далее представлены принципы действия наиболее распространенных БСУ, способы детекции и чувствительность выявления анализируемых молекул. Основной акцент сделан на гибридационный анализ нуклеиновых кислот (НК), которые являются одним из наиболее значимых с диагностической точки зрения аналитов.

БС – аналитическое устройство, в котором распознающий элемент содержит мате-

---

\* Исследование выполнено при финансовой поддержке МОиН РФ (ГК № П1073), РФФИ (10-04-01492-а), интеграционных грантов СО РАН (86), программ Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов».

риал, способный к специфическому связыванию биомолекул [7–10]. В основе работы биосенсорных систем лежит реализация различных специфичных физико-химических и / или биохимических процессов: образование гибридационного комплекса между комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот, фермент-субстратного комплекса, комплекса лиганда с рецептором (антиген / антитело) или же накопление продуктов превращения в составе таких межмолекулярных ассоциатов.

Распознающий элемент может реагировать непосредственно на присутствие анализируемого компонента или генерировать сигнал, обусловленный содержанием аналита в образце. Далее, на основе того или иного физического принципа образование специфического комплекса между распознающим элементом и анализируемым веществом переводится в регистрируемый сигнал. Существует большое количество физических преобразователей (транзьюсеров), используемых в биосенсорных системах: оптические, электрохимические, микромеханические, спектроскопические, термические, пьезоэлектрические и др. Принципиальная схема организации биосенсорных устройств представлена на рисунке.

Условно все подходы к детекции аналита, применяемые в сенсорных технологиях, можно разделить на два принципиально различных типа: без использования репортерных групп («label-free») [11] и в присутствии таковых [12]. В первом случае детектируют непосредственно факт связывания анализируемой молекулы с распознающим элементом сенсора, который может быть зарегистрирован, во втором – в качестве генераторов сигнала могут выступать репортерные группы, позволяющие проводить детекцию во время или сразу после формирования специфического комплекса. Различают прямой метод детекции репортерной группы и метод опосредованной визуализации (например, после проведения фермент-зависимых реакций), основанный на превращении специфических субстратов, обеспечивающих появление регистрируемого сигнала. Присутствие анализируемой мишени в образце может быть выявлено как при появлении на распознающем элементе сигнала от репортерной группы, так и при «выключении» исходного сигнала (например,

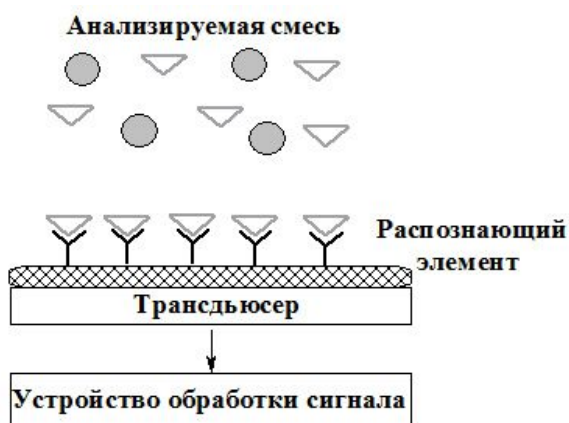


Схема биосенсорного устройства:  
 Y – распознающий слой биосенсора;  $\nabla$  – анализируемая молекула;  $\bigcirc$  – примеси в растворе аналита

тушение флуоресценции). К соединению, используемому в качестве метки, предъявляются общие требования: простота введения в систему, детекция в малых количествах, стабильность в условиях проведения анализа и хранения [13].

По типу детектируемого сигнала существующие биосенсорные устройства можно классифицировать на:

- оптические, основанные на изменении характеристик светового потока при появлении специфического связывания аналита с распознающим элементом, например, поглощении [7], флуоресценции [14], поверхностном плазмонном резонансе [15] и других оптических явлений;
- электрохимические, основанные на измерении таких характеристик ячейки, как потенциал (потенциометрические) [7], сила тока окисления или восстановления электроактивных частиц (амперометрические, вольтамперометрические) [11] либо электропроводность (кондуктометрические) [16];
- микромеханические [17; 18], основанные на изменении характеристик поверхности в зависимости от массы вещества, адсорбированного на нее.

Оптические биосенсоры являются одной из важнейших категорий химических сенсоров, их действие основано на анализе поглощения (абсорбции) или отражения света

(в том числе поверхностный плазмонный резонанс) и люминесценции. При этом детекция аналита основывается на регистрации изменений характеристик оптических сред (коэффициентов преломления, отражения и др.) от концентраций определяемых веществ. Оптические сенсоры позволяют при необходимости проводить детекцию сигнала в режиме реального времени, что дает возможность не только регистрировать взаимодействие молекул, но и оценивать кинетические характеристики данного процесса. Существует множество оптических БС для выявления нуклеиновых кислот (НК), они включают использование в качестве репортерных групп флуоресцентных [12], хемилюминесцентных соединений [19], золотых и серебряных наночастиц [20].

Наиболее распространенными репортерными группами в НК-анализе являются флуоресцентные красители (флуорофоры), обладающие способностью излучать свет при возбуждении их коротковолновым светом [12]. Способы генерации флуоресцентного сигнала очень разнообразны и чаще всего определяются условиями конкретной задачи. В анализе НК для детекции сигнала в режиме реального времени используют принципы взаимного влияния флуорофоров, например, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET – Fluorescence Resonance Energy Transfer) [21] – метод, основанный на переносе энергии между двумя флуорофорами, один из которых является донором, а другой – акцептором энергии. Таким образом, при сближении двух флуорофоров – донора (Fd) и акцептора (Fa), например, при «сэндвич»-гибридизации двух олигонуклеотидных зондов на комплементарной ДНК-мишени, возбуждении донора (Fd), вместо его флуоресценции будет происходить передача энергии на акцептор (Fa) и наблюдаться тушение флуоресценции донора или появление более длинноволнового флуоресцентного сигнала от акцептора (см. таблицу, А). Примером пары флуорофоров донор-акцептор являются флуоресцеин и родамин и их производные [21].


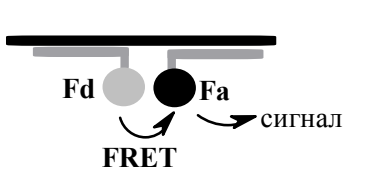
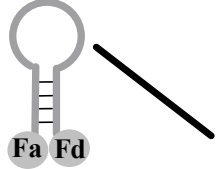
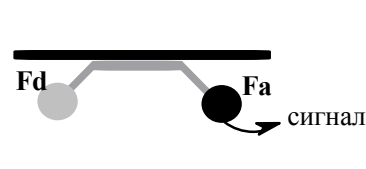
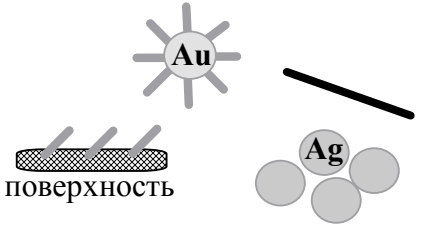
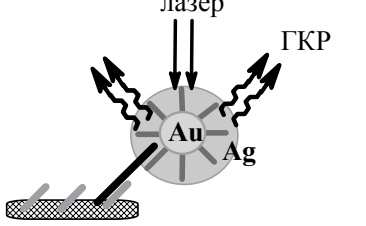
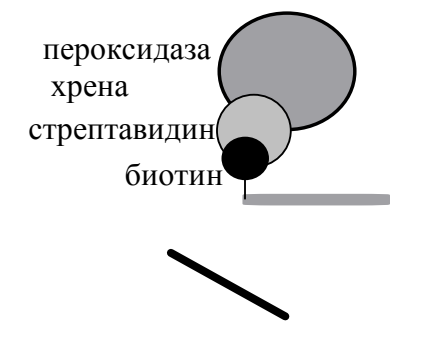
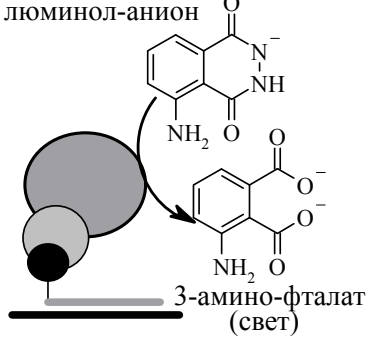

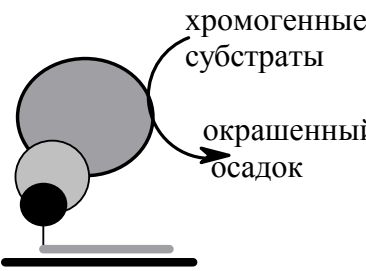
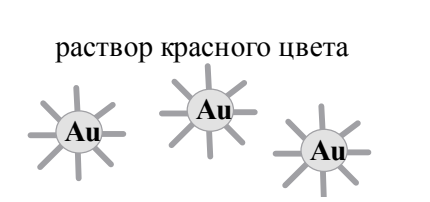

Реализацию FRET также можно осуществлять в формате использования специальных зондов, например, «молекулярных маяков» (*molecular beacon*) – шпилечных олигонуклеотидов, состоящих из последовательности, комплементарной ДНК-мишени, и самокомплементарных концевых участков

с присоединенными флуорофором и тушителем на 5'- и 3'-концах соответственно (см. таблицу, Б). В естественном состоянии оба конца молекулярного маяка находятся в непосредственной близости друг от друга, в результате чего происходит тушение флуоресценции. В присутствии ДНК-мишени молекулярные маяки претерпевают конформационные изменения, формируя гибридный комплекс, флуорофор (Fd) и тушитель (Fa) перестают контактировать друг с другом и наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции [22]. Известно использование молекулярных маяков в методах гетерофазной гибридации для разработки ДНК-сенсоров [23]. Высокая специфичность ДНК-анализа с использованием молекулярных маяков позволяет создавать на их основе тест-системы, определяющие не только наличие специфической последовательности, но и локальные нарушения в ее составе [24].



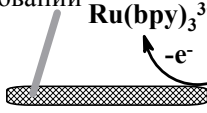
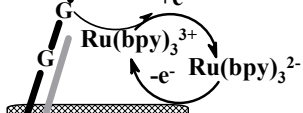
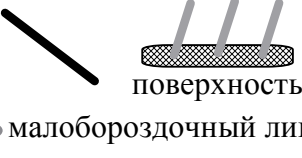
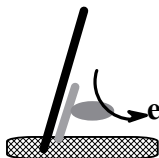

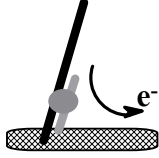
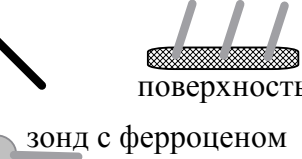
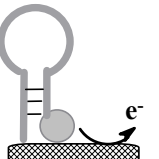
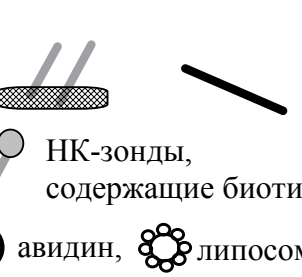
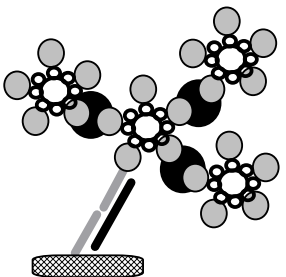
Помимо флуоресцентных красителей в качестве репортерных групп применяют квантовые точки (*quantum dots*) – наночастицы полупроводников (например, ZnS, CdSe) [25], обладающие собственной флуоресценцией, высокой степенью химической и фотохимической стабильности, широкими спектрами возбуждения.

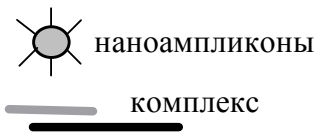
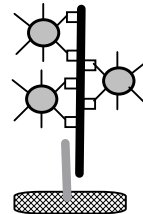
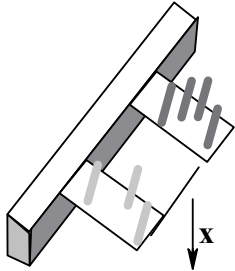
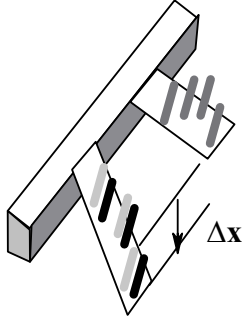
Эффект усиленного поверхностью гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) (Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy) [26] – один из современных методов обнаружения и идентификации биомолекул с высокой чувствительностью, вплоть до детекции одиночных молекул. Огромное (в ряде случаев до 10 порядков) усиление комбинационного рассеяния света молекулами, находящимися вблизи поверхности металлических подложек, обусловлено двумя механизмами: электромагнитным, связанным с увеличением локального электромагнитного поля вблизи поверхности, и молекулярным, т. е. за счет образования новых возбужденных состояний комплекса молекула-металл (см. таблицу, В). В качестве таких поверхностей могут быть использованы металлические пленки с высокой шероховатостью, например, электроды в электрохимической ячейке после проведения этапа травления их поверхности в ходе окислительно-восстановительного цикла, стеклянные поверхности, покрытые слоем серебра, металлические наночастицы

Примеры биосенсорных устройств  
для гибридационного анализа нуклеиновых кислот

№	Основа системы детекции	Система анализа <u>НК-матрица</u> — НК-зонды	Сигнальный продукт	Ссылка
<b>Оптические биосенсоры</b>				
А	Резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET)			[21]
Б	«Молекулярные маяки»			[22]
В	Гигантское комбинационное рассеяние (ГКР)			[28]
Г	Хемилюминесценция			[34]
Д	Колориметрическая детекция			[40]
Е	Колориметрическая детекция с использованием коллоидного золота			[20]

Продолжение таблицы

№	Основа системы детекции	Система анализа <u>НК-матрица</u> <u>НК-зонды</u>	Сигнальный продукт	Ссылка
Электрохимические биосенсоры				
Ж	Кремниевые нанопроводники	 поверхность		[53]
З	Окисление гуаниновых оснований ДНК-мишени	НК-зонды без G-оснований  $\text{Ru(bpy)}_3^{3+}$ → $\text{Ru(bpy)}_3^{2-}$ + $e^-$	G-содержащая НК-матрица  $\text{Ru(bpy)}_3^{3+}$ → $\text{Ru(bpy)}_3^{2-}$ + $e^-$ + $+e^-$	[58]
И	Малобороздочные лиганды	 поверхность ● малобороздочный лиганд	 $e^-$	[60]
К	Интеркаляторы	 поверхность ● интеркалятор	 $e^-$	[61]
Л	Ферроцен	 поверхность ● зонд с ферроценом	 $e^-$	[46]
М	Электрохимическая ферментативная система	эстераза ● микроРНК поверхность	эстераза ● ДНК-РНК дуплекс поверхность	[66]
Микромеханические биосенсоры				
Н	Липосома	 НК-зонды, содержащие биотин ● авидин, ● липосома		[69]

№	Основа системы детекции	Система анализа НК-матрица ————— НК-зонды	Сигнальный продукт	Ссылка
О	ЭККМ при использовании «наноампликонов»			[17]
П	Кантилевер			[80]

в коллоидных суспензиях и др. Спектры ГКР регистрируют с помощью стандартной аппаратуры для получения спектров комбинационного рассеяния [27].

Детекция молекул методом ГКР имеет ряд преимуществ по сравнению с флуоресценцией. Рамановский краситель (ГКР-активная молекула) может быть как флуоресцентным, так и нефлуоресцентным, а его незначительная химическая модификация может привести к образованию красителя с резко различающимся от исходного Рамановским спектром, даже если оба красителя имеют фактически неразличимые флуоресцентные спектры. Кроме того, полосы поглощения в УФ-области спектра и полосы испускания флуоресцентных красителей достаточно широкие и максимальное число молекулярных флуорофоров, которые могут использоваться в одном эксперименте, ограничено 3 или 4 остатками. Широкие полосы поглощения и испускания света флуорофорами могут накладываться друг на друга. В ГКР-спектре те же самые красители имеют более узкие сигналы, что потенциально позволяет использовать в системе большее число репортерных групп, а следовательно, и выявлять большее число аналитов в одном

мультиплексном анализе [28]. Возможно выявление анализируемой последовательности ДНК, основанное как на появлении сигнала ГКР [29], так и на его исчезновении [30], например, при использовании шпильчатых ДНК-зондов, несущих ГКР-активную метку и иммобилизованных на золотые наночастицы (по аналогии с «молекулярными маяками»). Повышение чувствительности анализа выявления ДНК методом ГКР реализуют с использованием золотых наночастиц, а усиления сигнала добиваются путем нанесения металлического серебра на их поверхность [28].

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) применяют при разработке высокочувствительных методов регистрации специфических межмолекулярных взаимодействий на границе сенсорного металлизированного слоя и анализируемого раствора [31]. Призмы, используемые как оптические элементы в методе ППР, обычно изготавливают из кварца, сенсорную поверхность которых покрывают тонкой пленкой металла (Au, Ag, Al или Cu). Поверхностные плазмоны реализуются на границе твердого тела (металла или полупроводника) и представляют собой квантовые осцилляции поверх-

ностных зарядов, возникающих на границе раздела фаз под действием внешних электромагнитных полей. Поверхностные плазмоны могут возбуждаться электронными пучками или светом. Свет лазера, проходя через призму, падает на металлическую поверхность и отражается от нее по всем направлениям за исключением критического угла  $\theta$ . Величина  $\theta$  строго зависит от коэффициента преломления слоя, прилегающего к поверхности сенсора, и изменяется при появлении на поверхности анализируемых молекул. Таким образом, оценивая изменения критического угла, можно определить изменения, происходящие на поверхности сенсора. В случае конструирования ДНК-сенсоров с использованием ППР НК-зонд иммобилизуют на сенсорную поверхность и детектируют изменение показателя преломления после образования комплекса с анализируемой ДНК без использования репортерных групп. Фиксируя изменения коэффициента преломления в режиме реального времени, можно определить количество ДНК-мишени, провести оценку кинетических параметров процесса связывания. Чувствительность ППР-опосредованной детекции НК составляет порядка  $10^{-9}$  М [15], а в ряде случаев при использовании золотых наночастиц может достигать  $\sim 10^{-15}$  М [32].

Хемилюминесценцией (ХЛ) называется люминесценция, реализуемая в результате химической реакции. ХЛ имеет две стадии: химическую, в которой происходит формирование продукта реакции, находящегося в возбужденном электронном состоянии, и физическую, когда данный продукт при переходе в основное электронное состояние испускает свет. Измерение ХЛ биологических проб является чувствительным методом исследования биомолекул, применяемым как в лабораторной, так и клинической практиках [33]. Химические активаторы ХЛ – это соединения, вступающие в химические реакции, например, с активными формами кислорода или органическими свободными радикалами, в ходе которых образуются молекулы, находящиеся в нестабильном возбужденном электронном состоянии. Хорошо известными примерами таких активаторов могут служить люминол и близкие ему по химической структуре соединения. Отсутствие необходимости возбуждения светом и нулевое фоновое свече-

ние являются преимуществами таких систем перед флуоресцентными методами. Часто в хемилюминесцентном анализе применяют фермент-опосредованные системы детекции с использованием таких ферментов, как пероксидаза хрена [34], щелочная фосфатаза [19], глюкозооксидаза [35] и др., генерирующих хемилюминесцентный сигнал в результате протекания ферментативного превращения специальных субстратов. Так, хемилюминесцентное окисление люминола, катализируемое пероксидазой хрена в составе конъюгата со стрептавидином, использовали для детекции биотинилированной ДНК [34] (см. таблицу, Г). Предел обнаружения модельной последовательности ДНК составил  $5 \times 10^{-11}$  М.

Отдельно отметим системы детекции биомолекул, основанные на биолюминесценции. В качестве генераторов аналитического сигнала в этом случае могут выступать выделенные из биолюминесцентных организмов фотопротеины, например, обелин [36] или акварин [37]. Благодаря высокому квантовому выходу фотохимической реакции, возможности получения рекомбинантных фотопротеинов и их стабильных конъюгатов с другими биомолекулами, а также наличию современной фоточувствительной техники такие метки успешно используют в аналитических системах для определения различных биомолекулярных маркеров [37–39], включая ДНК [36]. Биолюминесцентные системы детекции позволяют достоверно выявлять анализируемую последовательность ДНК в концентрации  $10^{-11}$  М [36].

Одним из самых простых способов детекции ДНК является колориметрический метод, основанный на установлении присутствия вещества или его концентрации по интенсивности окраски растворов, которую определяют либо визуально, либо спектрофотометрически. Преимуществом колориметрических подходов является простота анализа. Методы колориметрической детекции с использованием ферментных систем подобны хемилюминесцентным способам, однако вместо хемилюминесцентных субстратов в данном случае используют хромогенные, при ферментативном превращении которых наблюдается накопление цветных продуктов, например, синего осадка при контакте щелочной фосфатазы с субстратами BCIP (5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат

динатриевая соль) и NBT (нитротетразолиевый синий) [40] (см. таблицу, Д). Такой сигнал можно регистрировать в том числе и визуально. Однако следует учитывать, что фермент-опосредованный анализ требует четкого выполнения нескольких жестко регламентированных по времени и связанных между собой этапов. Кроме того, ферментативные системы анализа дороги и требуют строгого контроля каталитической активности.

Помимо ферментативных систем широкое развитие получили колориметрические схемы детекции ДНК с использованием наночастиц золота, что обусловлено способностью коллоидного золота менять цветовую окраску раствора при переходе из состояния одиночных частиц (красный цвет) к агрегированным (синий цвет) [41; 42] (см. таблицу, Е). Процесс агрегации золотых наночастиц в растворе может быть зафиксирован спектрофотометрически или визуально. Данный подход позволяет детектировать  $10^{-9}$ – $10^{-12}$  М ДНК-мишени [43]. В случае перенесения данного подхода в гетерофазный формат анализа возможно усиление сигнала путем дополнительного осаждения металлического серебра на поверхности золотых частиц, что позволяет выявлять ДНК-мишень в ультранизких концентрациях (до  $10^{-18}$  М) [44].

Электрохимические сенсоры широко используют для анализа различных классов соединений, в том числе и последовательностей ДНК [45]. В электрохимическом сенсоре определяемый компонент реагирует с чувствительным слоем непосредственно на электроде или в объеме слоя раствора вблизи электрода. В связи с тем, что электрохимические реакции передают электрический сигнал, нет необходимости в устройстве преобразования сигнала, а детекция может быть осуществлена электрохимическим анализатором [45]. Простота электрохимических систем, экономичность, возможность миниатюризации и создания портативных устройств, обеспечивающих чувствительную и селективную детекцию анализируемых веществ, позволяют использовать такие устройства не только в исследовательских, но и в практических целях. В зависимости от способа измерения сигнала электрохимические сенсоры можно разделить на потенциометрические, измеряющие потенциал ячейки, пропорциональный логарифму кон-

центрации определяемого вещества; вольт-амперометрические (амперометрические), измеряющие силу тока, проходящего через поверхность электрода, величина которого прямо пропорциональна концентрации электрохимически активного (т. е. способного к окислению или восстановлению) анализируемого вещества; кондуктометрические, измеряющие электропроводность аналитической ячейки, которая чувствительна к изменению состава раствора при реализации химической реакции или комплексообразования [7].

Существующие электрохимические подходы к детекции НК можно разделить на методы с использованием репортерных групп, например, ферроцен [46], наночастиц [47], малобороздочных лигандов [48], интеркаляторов [49] и без таковых («label-free») [11].

Все большее распространение благодаря своей простоте получают методы выявления НК, основанные на окислительно-восстановительных реакциях, происходящих непосредственно с ДНК. При этом количество ДНК, восстановленной или окисленной, может свидетельствовать о количестве ДНК-мишени, образовавшей комплекс с НК-зондом, присоединенным к поверхности электрода [11]. Наиболее электрохимически активным азотистым основанием является гуанин, параметры окисления которого четко отличимы от окисления других оснований [50].

Авторами [11] описана детекция ДНК с использованием метода дифференциальной импульсной вольтамперометрии, основанной на окислении остатков гуанина в последовательности НК-зонда, иммобилизованного на электрод. Образование ДНК-дуплекса приводило к предотвращению окисления гуанина и, следовательно, к снижению величины регистрируемого сигнала. Для повышения чувствительности (вплоть до  $2,7 \times 10^{-10}$  М) и специфичности метода в качестве зондов авторы использовали пептидил нуклеиновые кислоты (ПНК). ПНК – аналог ДНК, в котором отрицательно заряженный сахарофосфатный остов заменен незаряженной псевдопептидной цепочкой, состоящей из повторяющихся остатков N-(2-аминоэтил) глициновых звеньев, связанных амидными связями. Другим способом усовершенствования таких систем детекции можно считать использование



НК-зондов, в которых остатки гуанина заменены инозином, предпочтительно связывающимся с цитозиновыми основаниями. В этом случае при гибридизационном анализе появление сигнала окисления гуанина свидетельствует об образовании комплекса именно с ДНК-аналитом, содержащим репортерные остатки гуанина.

Однако применение данных методов затруднено значительными фоновыми токами в условиях, требуемых для прямого окисления ДНК [51]. Кроме того, неспецифический сигнал в такой системе анализа может появляться за счет ДНК, неспецифически адсорбированной на электроде.

При разработке электрохимических сенсоров для определения НК используют методы, основанные на изменении электрических свойств поверхности: импеданса (полного сопротивления), адмиттанса (полной проводимости), емкости системы. Такие транзюсеры позволяют детектировать процессы, сопровождающиеся изменением общего числа растворенных ионов, их заряда или подвижности. При изучении зависимости величин сопротивления или проводимости от частоты переменного тока получают спектры адмиттанса или импеданса. Соответствующий подход называется электрохимической импедансной спектроскопией (ЭИС) [7]. Примерами поверхностей, способных менять электрохимические свойства, являются полимерные пленки (производные политиофена) [16] (с чувствительностью  $5 \times 10^{-10}$  М [52]), кремниевые нанопроволоки (с чувствительностью  $10^{-12}$ – $10^{-15}$  М) [53] (см. таблицу, Ж). Взаимодействие иммобилизованного на поверхности нанопроволоки ПНК-зонда с анализируемой мишенью и формирование гетеродуплекса ПНК-ДНК приводит к появлению вблизи поверхности проводника отрицательных зарядов высокой плотности. Такое изменение окружения резко меняет сопротивление нанопроводника, что достоверно регистрируется и позволяет выявлять ДНК-аналит в концентрациях  $\sim 10^{-14}$  М [53].

Другим перспективным подходом при конструировании электрохимических биосенсоров является использование нанотрубок или наноканалов, формируемых биомолекулами [54; 55] или неорганическими материалами [56]. Так, показано, что перемещение отдельных молекул одноцепочечной ДНК через нанопоры (радиус 1,4 нм),

сформированные  $\alpha$ -гемолизином (из *Staphylococcus aureus*) в липидной мембране, можно достоверно регистрировать, анализируя ионный ток в электрической ячейке [54]. Однако БС, основанные на использовании биологических наноканалов, обладают рядом недостатков (фиксированный размер пор, неустойчивость двойного липидного слоя при изменении внешних параметров [55]), что ограничивает возможность их применения. Решить эти проблемы можно при использовании наноканалов, сформированных в стабильных неорганических материалах. Например, показана возможность селективного выявления одноцепочечной ДНК (в концентрации  $10^{-11}$  М) при ее прохождении сквозь кремниевые мембраны с наноканалами диаметром 20 нм [57]. В этом случае поверхность наноканалов модифицировали шпильчатыми олигонуклеотидными зондами, что уменьшало эффективное сечение каналов до 1–2 нм и позволяло достигать достоверное изменение электрической проводимости в ячейке при прохождении ДНК-аналита сквозь мембрану.

Прогресс в создании электрохимических биосенсоров стал возможен благодаря использованию в качестве окислителей медиаторов – диффузионно-подвижных низкомолекулярных веществ, которые служат переносчиками электронов. Преимущества медиаторов состоят в обратимости окислительно-восстановительных процессов, низких потенциалах окисления-восстановления и легкости поддержания постоянной концентрации. В качестве медиаторов обычно используют катионы переходных металлов (ионы  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ru}^{3+}$  и  $\text{Os}^{3+}$ ) и их комплексы (гексацианоферат  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ ), ферроцен, ряд органических красителей, например, метиленовый синий [45].

Пример БСУ для опосредованного определения ДНК с помощью полипиридиловых комплексов Ru (II) и Os (II) представлен в работе М. Е. Napier et al. [58] (см. таблицу, З). В этом случае наличие ДНК-аналита, т. е. остатков гуанина в его составе, обеспечивает реализацию каталитического цикла  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+} \rightarrow \text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+} \rightarrow \text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$  ( $\text{bpy} = 2,2'$ -бипиридин). Отсутствие гуанина в составе НК-зонда приводит к однократному окислению  $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ , тогда как полный цикл происходит только при наличии гуанина. Этот принцип применен для обнару-

жения ДНК на немодифицированном электроде, изготовленном из сплава индия с оксидом олова [58]. Чувствительность метода достигала  $5,5 \times 10^{-11}$  М ДНК-мишени, выявление различных последовательностей ДНК может быть реализовано в режиме параллельного анализа [59].

Для разработки электрохимических методов анализа последовательностей ДНК успешно используют стратегии с применением в качестве репортеров окислительно-восстановительных молекул, способных нековалентно связываться с ДНК-дуплексом, например, малобороздочных лигандов, таких как Hoechst 33258 [60] или интеркаляторов, например, метиленовый синий [49], доксорубин [61], этидий бромистый [62], а также других красителей и антибиотиков. При использовании данного подхода предел обнаружения анализируемой последовательности ДНК составляет  $\sim 10^{-11}$  М [48] (см. таблицу, И, К).

В электрохимическом анализе популярных методов с использованием репортерных групп, в качестве которых могут выступать окислительно-восстановительно активные соединения, в частности ферроцен и его производные [63]. Благодаря низкому окислительно-восстановительному потенциалу, а также стабильности окисленных и восстановленных форм ферроцен используется в качестве репортерной группы при анализе ДНК. Чаще всего ферроцен в составе модифицированного нуклеозидтрифосфата или олигонуклеотида вводят в систему электрохимической детекции при ферментативном удлинении последовательности ДНК. В такой системе ДНК-процессирующие ферменты могут не только участвовать в процессе формирования продукта, но и обеспечивать дополнительную селективность анализа. Предложена стратегия выявления точечных мутаций, основанная на окислении ферроценовой метки, которая оказывается в непосредственной близости к поверхности электрода после лигирования сформированного дуплекса и последующего удаления анализируемой ДНК [46] (см. таблицу, Л). Чувствительность выявления анализируемой ДНК методом инверсионной вольтамперометрии составила  $\sim 10^{-12}$  М.

Использование ферментов в электрохимическом ДНК-анализе получило широкое распространение благодаря их способности преобразовывать единичные случаи форми-

рования гибридационного комплекса в детекцию большого числа образуемых ферментом сигнальных молекул, что ведет к существенному усилению регистрируемого сигнала. Обычно в электрохимических сенсорах используют пероксидазу хрена [64], глюкозооксидазу [65], эстеразу [66] и другие ферменты, которые являются относительно устойчивыми, недорогими и обладают высокой каталитической активностью. Создание таких сенсоров возможно при условии, что удастся подобрать такой продукт ферментативной реакции, который является электрохимически активным, т. е. способен быстро и желательно обратимо окисляться или восстанавливаться на электроде при наложении на него соответствующего потенциала. Примером электрохимического обнаружения НК с использованием фермента эстеразы является селективная детекция микроРНК в составе сигнального четырехкомпонентного гибридационного комплекса, сформированного на поверхности электрода (см. таблицу, М). При образовании гибридационного комплекса фермент в составе олигонуклеотидного конъюгата оказывается в непосредственной близости от электрода и обеспечивает превращение субстрата *p*-аминофенилбутират в *p*-аминофенол, который, в свою очередь окисляясь на электроде, дает достоверно регистрируемый электрохимический сигнал. В отсутствие микроРНК гибридационный комплекс вблизи электрода оказывается нестабильным и аналитический сигнал не наблюдается. Предложенный прототип биосенсора позволяет детектировать микроРНК с пределом обнаружения  $\sim 10^{-12}$  М.

Другим примером успешного применения ферментативных систем в электрохимических биосенсорах является подход к выявлению ДНК цитомегаловируса, разработанный с использованием биотинилированных олигонуклеотидных зондов и конъюгата стрептавидин-пероксидазы хрена. Фермент катализирует превращение *o*-фенилендиамина в 2,2'-диаминобензол, который как электрохимически активный продукт [67] может быть обнаружен дифференциальной импульсной вольтамперометрией. В такой системе чувствительность выявления анализируемой ДНК составила  $\sim 10^{-16}$  М.

Рассмотрим микрохимические (пьезоэлектрические) сенсоры. Пьезоэлектричест-

во – явление возникновения поляризации диэлектрика под действием механических напряжений (прямой пьезоэлектрический эффект) и возникновения механических деформаций под действием электрического поля (обратный пьезоэлектрический эффект). Прямой и обратный пьезоэлектрические эффекты наблюдаются в одних и тех же кристаллах – пьезоэлектриках. В сенсорах применяют как природные (кварц, турмалин), так и керамические пьезоэлектрики (титанаты бария и свинца и др.), подобными свойствами обладают и некоторые полимерные материалы (поливинилиденфторид). Каждый кристалл имеет собственную резонансную частоту колебаний, которая может зависеть от его окружения. Значение такой резонансной частоты зависит от массы как самого кристалла, так и адсорбированного на нем материала, что может быть измерено с исключительно высокой точностью [7].

Широкое распространение получили системы и устройства на базе так называемых кварцевых кристаллических микровесов (ККМ) [7]. Анализатор работает на основе метода взвешивания микровесами определяемого компонента, сорбированного чувствительным слоем. Однако при использовании этой системы отмечены проблемы, связанные с недостатком чувствительности и высоким уровнем шума. Существует модификация ККМ со специальной схемой усиления сигнала, называемая электрохимическими кварцевыми кристаллическими микровесами (ЭККМ). Устройство детектирует изменение массы электрода, происходящее вследствие адсорбции или десорбции вещества в поверхностном монослое, осаждения или растворения электроактивных веществ в ходе окислительно-восстановительных процессов. За счет включения олигонуклеотидных зондов в состав покрывающего пьезокристалл слоя можно достичь существенно более высокой чувствительности сенсоров [17]. Известны ЭККМ-биосенсоры для выявления НК-дуплексов, содержащих наночастицы (золотые [17],  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  [68]), липосомы [69]) либо не содержащих репортерные группы [16]. Усиление сигнала в формате ЭККМ может быть достигнуто и с использованием уже описанных ранее ферментативных меток (конъюгат авидин-щелочная фосфатаза и 5-бром-4-хлор-3-индолил фосфат [70] с пределом чувствительности  $\sim 3 \times 10^{-16}$  М) или с помощью ме-

ток на основе липосом и дендримерных структур (см. таблицу, Н) [69] (предел чувствительности к ДНК-аналиту  $5 \times 10^{-12}$  и  $10^{-13}$  М соответственно), а также с применением золотых наночастиц, например, модифицированных случайным набором тетрауклеотидов, названных авторами «наноампликонами» (см. таблицу, О) [17]. Предел выявления одноцепочечной геномной ДНК с помощью наноампликонов составил  $1,7 \times 10^{-19}$  М, что является максимальным уровнем чувствительности среди рассмотренных аналитических приемов.

Кроме того, показано, что при использовании белка MutS с помощью ЭККМ-биосенсора удается различать совершенные ДНК-дуплексы и дуплексы с некомплементарными участками [71]. Предел обнаружения дцДНК, содержащей несоответствия (мисматч T / G или нуклеотидные выпетливания), составил  $10^{-9}$  М.

Другой тип БСУ, позволяющий проводить регистрацию малых масс, – это микроскопические резонансные системы – микровесы на основе кантилеверов для атомно-силовой микроскопии (АСМ), которые позволяют достичь порога чувствительности вплоть до одиночных молекул [20; 72]. Кантилевер для АСМ обычно представляет собой зонд в виде иголочки, выращенной из прочного неорганического материала на конце гнущейся балки. Кантилеверы могут эффективно применяться для изучения химических процессов, происходящих при связывании специфических молекул на их поверхность, что позволяет создавать на их основе высокочувствительные биосенсоры, способные обнаруживать, например, НК-аналит без использования репортерных групп [73–78]. Общий принцип работы сенсора в этом случае можно представить следующим образом. В результате взаимодействия модифицированной поверхности кантилевера и детектируемого вещества возникает разность сил поверхностного натяжения на противоположных сторонах кантилевера, под действием которой кантилевер изгибается. Такой изгиб регистрируется при помощи оптической лазерной системы [72]. Часто в сенсорном устройстве используют не один кантилевер, а их набор, прикрепленный на общем основании [72; 79]. Продемонстрировано, что регистрация оцДНК использованием такого типа сенсоров с двумя кантилеверами позволяет вы-

явить аналит в концентрации до  $10^{-11}$  М [80] (см. таблицу, П).

### Заключение

Представлены основные подходы к анализу нуклеиновых кислот и конструированию на их основе биосенсорных систем, обеспечивающих быстрое, высокоспецифичное и чувствительное выявление анализируемых молекул. Следует отметить, что все описанные подходы применяют не только при анализе нуклеиновых кислот, основанных на способности НК образовывать комплексы с комплементарными последовательностями, но и при анализе других молекул, обеспечивающих формирование специфического комплекса. Биосенсорные устройства позволяют с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять биомолекулы, что в настоящее время является важной научной и практической задачей. С каждым днем совершенствуются технологии, разрабатываются новые подходы к созданию биосенсорных устройств, позволяющих быстро и достоверно получить информацию о наличии интересующих молекулярных маркеров.

### Список литературы

1. *Vo-Dinh T., Cullum B.* Biosensors and Biochips: Advances in Biological and Medical Diagnostics // *J. Anal. Chem.* 2000. Vol. 366. P. 540–551.
2. *Monk D. J., Walt D. R.* Optical Fiber-based Biosensors // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. Vol. 379. P. 931–945.
3. *Chambers J. P., Arulanandam B. P., Matata L. L., Weis A., Valdes J. J.* Biosensor Recognition Elements // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2008. Vol. 10. P. 1–12.
4. *Варфоломеев С. Д.* Биосенсоры // Соросовский образовательный журн. 1997. Т. 1. С. 45–49.
5. *Diehl F., Grahlmann S., Beier M., Hoheisel J. D.* Manufacturing DNA Microarrays of High Spot Homogeneity and Reduced Background Signal // *Nucleic Acids Res.* 2001. Vol. 29. E38.
6. *Wilson D., Nock S.* Recent developments in protein microarray technology // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003. Vol. 42. P. 494–500.
7. *Эггинс Б.* Химические и биологические сенсоры: Пер. с англ. М., 2005.
8. *Mascini M., Palchetti I., Marrazza G.* DNA Electrochemical Biosensors // *J. Anal. Chem.* 2001. Vol. 369. P. 15–22.
9. *Wang J.* Electrochemical Nucleic Acid Biosensors // *Analytica Chimica Acta.* 2002. Vol. 469. P. 63–71.
10. *Zhang Y., Zhang K., Ma H.* Electrochemical DNA Biosensors Based on Gold Nanoparticles / Cysteamine / Poly (glutamic acid) Modified Electrode // *Am. J. Biomed. Sci.* 2009. Vol. 1. P. 115–125.
11. *Kerman K., Ozkan D., Kara P., Erdem A., Meric B., Nielsen P. E., Ozsoz M.* Label-free Bioelectronic Detection of Point Mutation by Using Peptide Nucleic Acid Probes // *Electroanalysis.* 2003. Vol. 15. P. 667–670.
12. *Ha T.* Single-molecule Fluorescence Methods for the Study of Nucleic Acids // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2001. Vol. 11. P. 287–292.
13. *Kricka L. J.* Nucleic Acid Detection Technologies – Labels, Strategies, and Formats // *Clin. Chem.* 1999. Vol. 45. P. 453–458.
14. *Vo-Dinh T., Alarie J. P., Isola N., Landis D., Wintenberg A. L., Ericson M. N.* DNA Biochip Using a Phototransistor Integrated Circuit // *Anal. Chem.* 1999. Vol. 71. P. 358–363.
15. *Homola J., Vaisocherova H., Dostalek J., Piliarik M.* Multi-analyte Surface Plasmon Resonance Biosensing // *Methods.* 2005. Vol. 37. P. 26–29.
16. *Gautier C., Cougnon C., Pilard J. F., Casse N. J.* Label-free Detection of DNA Hybridization Based on EIS Investigation of Conducting Properties of Functionalized Polythiophene Matrix // *Electroanal. Chem.* 2006. Vol. 587. P. 276–280.
17. *Mo Z. H., Wei X. L.* Toward Hybridization Assays Without PCR Using Universal Nanoamplicons // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. Vol. 386. P. 2219–2223.
18. *Hansen K. M., Thundat T.* Microcantilever Biosensors // *Methods.* 2005. Vol. 37. P. 57–64.
19. *Xu D. K., Ma L. R., Liu Y. Q., Jiang Z. H., Liu Z. H.* Development of Chemiluminescent Biosensing of Nucleic Acids Based on Oligonucleotide-immobilized Gold Surfaces // *Analyst.* 1999. Vol. 124. P. 533–537.
20. *He L., Musick M. D., Nicewarner S. R., Salinas F. G., Benkovic S. J., Natan M. J., Keating C. D.* Colloidal Au-enhanced Surface Plasmon Resonance for Ultrasensitive Detection of DNA Hybridization // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. Vol. 122. P. 9071–9077.

21. *Cardullo R. A., Agrawal S., Flores C., Zamecnik P. C., Wolf D. E.* Detection of Nucleic Acid Hybridization by Nonradiative Fluorescence Resonance Energy Transfer // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1988. Vol. 85. P. 8790–8794.
22. *Giesendorf B., Vet J., Tyagi S., Mensink E., Trijbels F., Blom H. J.* Molecular Beacons: a New Approach for Semiautomated Mutation Analysis // *Clin. Chem.* 1998. Vol. 44. P. 482–486.
23. *Strohsahl C. M., Du H., Miller B. L., Krauss T. D.* Towards Single-spot Multianalyte Molecular Beacon Biosensors // *Talanta.* 2005. Vol. 67. P. 479–583.
24. *Zhao X., Tapeç-Dytioco R., Tan W.* Ultrasensitive DNA Detection Using Highly Fluorescent Bioconjugated Nanoparticles // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125. P. 114–118.
25. *Somers R. C., Bawendi M. G., Noceira D. G.* Cd – Se Nanocrystal Based Chem- / Bio- sensors // *Chem. Soc. Rev.* 2007. Vol. 36. P. 579–583.
26. *Fleischmann M.* Raman Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode // *Chem. Phys.* 1974. Vol. 26. P. 163–166.
27. *Yonzon C. R., Stuart D. A., Zhang X., McFarland A. D., Haynes C. L.* Towards Advanced Chemical and Biological Nanosensors // *Talanta.* 2005. Vol. 67. P. 438–448.
28. *Cao Y. W., Jin R. C., Mirkin C. A.* Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection // *Science.* 2002. Vol. 297. P. 1536–1540.
29. *Vo-Dinh T., Houck K., Stokes D. L.* Surface-enhanced Raman Gene Probes // *Anal. Chem.* 1994. Vol. 66. P. 3379–3383.
30. *Wabuyele M. B., Vo-Dinh T.* Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Sequence Using Plasmonics Nanoprobes // *Anal. Chem.* 2005. Vol. 77. P. 7810–7815.
31. *Kukanskis K., Elkind J., Melendez J., Murphy T., Miller G., Garner H.* Detection of DNA Hybridization Using the TISPR-1 Surface Plasmon Resonance Biosensor // *Anal. Biochem.* 1997. Vol. 274. P. 7–17.
32. *Yao X., Li X., Toledo F., Zurita-Lopez C., Gutova M., Momand J., Zhou F. M.* Sub-Attomole Oligonucleotide and p53 cDNA Determinations Via a High-resolution Surface Plasmon Resonance Combined with Oligonucleotide-capped Gold Nanoparticle Signal Amplification // *Anal. Biochem.* 2006. Vol. 354. P. 220–224.
33. *Marchand G., Broyer P., Lanet V., Delattre C., Foucault F., Menou L., Calvas B., Mallard F.* Opto-electronic DNA Chip-based Integrated Card for Clinical Diagnostics // *Biomed. Microdevices.* 2008. Vol. 10. P. 35–45.
34. *Marquette C. A., Thomas D., Degiuli A., Blum L. J.* Design of Luminescent Biochips Based on Enzyme, Antibody, or DNA Composite Layers // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. Vol. 377. P. 922–926.
35. *Marquette C. A., Blum L. J.* Conducting Elastomer Surface Texturing: a Path to Electrode Spotting Application to the Biochip Production // *Biosens. Bioelectron.* 2004. Vol. 20. P. 197–202.
36. *Борисова В. В., Пышная И. А., Пышный Д. В., Франк Л. А.* Высококчувствительный и быстрый метод выявления ДНК-фрагментов с использованием фотопротейна обелина как репортера // *Биоорг. химия.* 2008. Т. 34, № 6. С. 792–798.
37. *Zerefos P., Ioannou P., Traeger-Synodinos J., Dimissianos G., Kanavakis E., Christopoulos T.* Photoprotein Aequorin as a Novel Reporter for SNP Genotyping by Primer Extension-application to the Variants of Mannose-binding Lectin Gene // *Hum. Mutat.* 2006. Vol. 27. P. 279–285.
38. *Michelini E., Guardigli M., Magliulo M., Mirasoli M., Roda A., Simoni P., Baraldini M.* Bioluminescent Biosensors Based on Genetically Engineered Living Cells in Environmental and Food Analysis // *Anal. Lett.* 2006. Vol. 39. P. 1503–1515.
39. *Alloush H., Anderson E., Martin A., Ruddock M., Angell J., Hill Ph., Mehta P., Smith M., Smith J., Salisbury V.* A Bioluminescent Microbial Biosensor for in Vitro Pretreatment Assessment of Cytarabine Efficacy in Leukemia // *Clin. Chem.* 2010. Vol. 56. P. 1862–1870.
40. *Скобельцина Л. М., Пышный Д. В., Шликина И. Г., Табатадзе Д. Р., Дымищ Г. М., Зарытова В. Ф., Иванова Е. М.* Разработка колориметрической тест-системы для выявления точечных мутаций путем лигирования тандема коротких олигонуклеотидов на твердофазном носителе // *Молекуляр. биология.* 2000. Т. 34, № 3. С. 378–385.
41. *Baptista P., Doria G., Henriques D., Pereira E., Franco R.* Colorimetric Detection of Eukaryotic Gene Expression with DNA-derivatized Gold Nanoparticles // *J. Biotechnol.* 2005. Vol. 119. P. 111–117.
42. *Elghanian R., Storhoff J. J., Mucic R. C., Letsinger R. L., Mirkin C. A.* Selective Colori-

- metric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles // *Science*. 1997. Vol. 277. P. 1078–1081.
43. *Thaxton C. S., Georganopoulou D. G., Mirkin C. A.* Gold Nanoparticle Probes for the Detection of Nucleic Acid Targets // *Clin. Chim. Acta*. 2006. Vol. 363. P. 120–126.
44. *Taton T. A., Mirkin C. A., Letsinger R. L.* Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes // *Science*. 2000. Vol. 289. P. 1757–1760.
45. *Drummond T. G., Hill M. G., Barton J. K.* Electrochemical DNA Sensors // *Nat. Biotechnol.* 2003. Vol. 21. P. 1192–1199.
46. *Mearns F. J., Wong E. L. S., Short K., Hibbert D. B., Gooding J. J.* DNA Biosensor Concepts Based on a Change in the DNA Persistence Length Upon Hybridization // *Electroanalysis*. 2006. Vol. 18. P. 1971–1981.
47. *Merkoci A., Aldavert M., Marin S.* New Materials for Electrochemical Sensing V: Nanoparticles for DNA labeling // *Trends Anal. Chem.* 2005. Vol. 24. P. 341–345.
48. *Niu S. Y., Zhang S. S., Wang L., Li X. M.* Hybridization Biosensor Using di (1,10-phenanthroline) (imidazo [f]1,10-phenanthroline) Cobalt (II) as Electrochemical Indicator for Detection of Human Immunodeficiency Virus DNA // *J. Electroanal. Chem.* 2006. Vol. 597. P. 111–118.
49. *Lin X.-H., Wu P., Chen W., Zhang Y.-F., Xia X.-H.* Electrochemical DNA Biosensor for the Detection of Short DNA Species of Chronic Myelogenous Leukemia by Using Methylene Blue // *Talanta*. 2007. Vol. 72. P. 468–473.
50. *Wang J., Rivas G., Fernandes J. R., Paz J. L. L., Jiang M., Waymire R.* Indicator-free Electrochemical DNA Hybridization Biosensor // *Anal. Chim. Acta*. 1998. Vol. 375. P. 197–201.
51. *Wang J., Kawde A. N., Erdem A., Salazar M.* Magnetic Bead-based Label-free Electrochemical Detection of DNA Hybridization // *Analyst*. 2001. Vol. 126. P. 2020–2024.
52. *Fu Y., Yuan R., Chai Y., Zhou L., Zhang Y.* Coupling of a Reagentless Electrochemical DNA Biosensor with Conducting Polymer Film and Nanocomposite as Matrices for the Detection of the HIV DNA Sequences // *Anal. Lett.* 2006. Vol. 39. P. 467–482.
53. *Gao Z., Agarwal A., Trigg A., Singh N., Fang C., Tung C.-H., Fan Y., Buddharaju K. D., Kong J.* Silicon Nanowire Arrays for Label-free Detection of DNA // *Anal. Chem.* 2007. Vol. 79. P. 3291–3297.
54. *Kasianowicz J., Brandin E., Branton D., Deamer D.* Characterization of Individual Polynucleotide Molecules Using a Membrane Channel // *Proc. Natl Acad. Sci.* 1996. Vol. 93. P. 770–773.
55. *Nakane J., Wiggin M., Marziali A.* A Nanosensor for Transmembrane Capture and Identification of Single Nucleic Acid Molecules // *Biophysic. J.* 2004. Vol. 87. P. 615–621.
56. *Li S., Li J., Wang K., Wang C., Xu J., Chen H., Xia X., Huo Q.* A Nanochannel Array-based Electrochemical Device for Quantitative Label-free DNA Analysis // *ACS Nano*. 2010. Vol. 4. P. 6417–6424.
57. *Iqbal S. M., Akin D., Bashir R.* Solid-state Nanopore Channels with DNA Selectivity // *Nat. Nanotechnol.* 2007. Vol. 2. P. 243–248.
58. *Napier M. E., Loomis C. R., Sistare M. F., Kim J., Eckhardt A. E., Thorp H. H.* Probing Biomolecule Recognition with Electron Transfer: Electrochemical Sensors for DNA hybridization // *Bioconjugate Chem.* 1997. Vol. 8. P. 906–909.
59. *Popovich N. D.* Mediated Electrochemical Detection of Nucleic Acids for Drug Discovery and Clinical Diagnostics // *IVD Technol.* 2001. Vol. 7. P. 36–40.
60. *Ito K., Hashimoto K., Ishimori Y.* Quantitative Analysis for Solid-phase Hybridization Reaction and Binding Reaction of DNA Binder to Hybrids Using a Quartz Crystal Microbalance // *Anal. Chim. Acta*. 1996. Vol. 327. P. 29–35.
61. *Patolsky F., Katz E., Willner I.* Amplified DNA Detection by Electrogenerated Bioluminescence and by the Catalyzed Precipitation of an Insoluble Product on Electrodes in the Presence of the Doxorubicin Intercalator // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002. Vol. 41. P. 3398–3402.
62. *Liu S. H., Ye J. N., He P. G., Fang Y. H.* Voltammetric Determination of Sequence-specific DNA by Electroactive Intercalator on Graphite Electrode // *Anal. Chim. Acta*. 1996. Vol. 335. P. 239–243.
63. *Wlassoff W. A., King G. C.* Ferrocene Conjugates of dUTP for Enzymatic Redox Labelling of DNA // *Nucleic Acids Res.* 2002. Vol. 30. E58.
64. *Azek F., Grossiord C., Joannes M., Limoges B., Brossier P.* Hybridization Assay at a Disposable Electrochemical Biosensor for the Attomole Detection of Amplified Human Cy-

tomegalovirus DNA // *Anal. Biochem.* 2000. Vol. 284. P. 107–111.

65. Xie H., Zhang C. Y., Gao Z. Q. Amperometric Detection of Nucleic Acid at Femtomolar Levels with a Nucleic Acid / Electrochemical Activator Bilayer on Gold Electrode // *Anal. Chem.* 2004. Vol. 76. P. 1611–1617.

66. Sprinzl P. Electrochemical Detection of Micro RNA Via Gap Hybridization Assay // *Anal. Chem.* 2010. Vol. 82. P. 4434–4440.

67. Erdem A., Pividori M. I., Lermo A., Bonanni A., Valle M., Alegret S. Genomagnetic Assay Based on Label-free Electrochemical Detection Using Magneto-composite Electrodes // *Sens. Actuators. B.* 2006. Vol. 114. P. 591–596.

68. Mao X. L., Yang L. J., Su X. L., Li Y. B. A Nanoparticle Amplification Based Quartz Crystal Microbalance DNA Sensor for Detection of *Escherichia Coli* O157 : H7 // *Biosens. Bioelectron.* 2006. Vol. 21. P. 1178–1181.

69. Patolsky F., Lichtenstein A., Willner I. Amplified Microgravimetric Quartz-crystal-Microbalance Assay of DNA Using Oligonucleotide-functionalized Liposomes or Biotinylated Liposomes // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. Vol. 122. P. 418–419.

70. Willner I., Patolsky F., Weizmann Y., Willner B. Amplified Detection of Single-base Mismatches in DNA Using Microgravimetric Quartz-crystal-microbalance Transduction // *Talanta.* 2002. Vol. 56. P. 847–851.

71. Su X., Robelek R., Wu Y., Wang G., Knoll W. Detection of Point Mutation and Insertion Mutations in DNA Using a Quartz Crystal Microbalance and MutS, a Mismatch Binding Protein // *Anal. Chem.* 2004. Vol. 76. P. 489–494.

72. Lang H. P., Hegner M., Gerber C. Cantilever Array Sensors // *Mater. Tod.* 2005. Vol. 8. P. 30–36.

73. Ziegler C. Cantilever-based Biosensors // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. Vol. 379. P. 946–959.

74. Lavrik N. V., Sepaniak M. J., Datskos P. G. Cantilever Transducers as a Platform for Chemical and Biological Sensors // *Rev. Sci. Instrum.* 2004. Vol. 75. P. 22–29.

75. Lechugaa L. M., Tamayo J., Alvarez M., Carrascosa L. G., Yufera A., Dold'an R., Peralias E., Rueda A., Plaza J. A., Zinoviev K., Dominguez C., Zaballos A., Moreno M., Martinez C., Wenn D., Harris N., Bringer C., Bardinal V., Camps T., Vergnenegre C., Fontaine C., Diaz V., Bernad A. A Highly Sensitive Microsystem Based on Nanomechanical Biosensors for Genomics Applications // *Sens. Actuat. B: Chem.* 2006. Vol. 118. P. 2–10.

76. Zhang J., Lang H. P., Huber F., Bietsch A., Grange W., Certa U., Mckendry R., Guntherodt H., Hegner M., Gerber C. Rapid and Label-free Nanomechanical Detection of Biomarker Transcripts in Human RNA // *Nat. Nanotech.* 2006. Vol. 1. P. 214–220.

77. Backmann N., Zahnd C., Huber F., Bietsch A., Pluckthun A., Lang H. P., Guntherodt H. J., Hegner M., Gerber C. A Label-free Immunosensor Array Using Single-chain Antibody Fragments // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005. Vol. 102. P. 14587–14592.

78. Fritz J. Cantilever Biosensors // *Analyst.* 2008. Vol. 133. P. 855–863.

79. Calleja M., Nordstrom M., Alvarez M., Tamayo J., Lechuga L. M., Boisen A. Highly Sensitive Polymer-based Cantilever-sensors for DNA Detection // *Ultramicroscopy.* 2005. Vol. 105. P. 215–222.

80. Fritz J., Baller M. K., Lang H. P., Rothuizen H., Vettiger P., Meyer E., Guntherodt H. J., Gerber C., Gimzewski J. K. Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics // *Science.* 2000. Vol. 288. P. 316–320.

Материал поступил в редколлегию 05.04.2012