

DOI: 10.6060/tcct.20186101.5694

УДК: 543.054:543.42:543.45:544.7:66.095.2

**СТАТИЧЕСКАЯ И ДИНАМИЧЕСКАЯ СОРБЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ И БЕЛКОВ НА ПОВЕРХНОСТИ СОРБЕНТОВ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОТОЛЩИННЫМИ СЛОЯМИ ПОЛИМЕРОВ**

Д.-Дж. Льяо, Д.И. Зыбин, А.И. Простякова, Е.Ю. Ягудаева, А.А. Вихров, А.А. Ищенко, В.П. Zubov, Д.В. Капустин

*В статье рассмотрены сорбционные свойства композиционных кремнеземных сорбентов, модифицированных нанослоями фторполимеров, полианилинов (ПАНИ) и полиарамидов, содержащих ароматический азот, фтор, а также донорные и акцепторные фрагменты, по отношению к нуклеиновым кислотам (ДНК и РНК) и белкам, различающимся молекулярной массой и pI. Применение исследованных сорбентов в пробоподготовке при молекулярной диагностике (в частности, при проведении ПЦР-анализа) не только обеспечивает одностадийное выделение нуклеиновых кислот, но также позволяет выделять белковые соединения. Впервые проведено сравнение свойств указанных материалов в режиме статической сорбции с применением компактных спин-колонок и в режиме динамической сорбции методом спектрально-корреляционной интерферометрии. Изучено влияние химического состава, морфологии и поверхностного заряда указанных полимерных покрытий на их сорбционные свойства. Обсуждены вероятные механизмы сорбции биополимеров на исследованных сорбентах. Использование разработанных подходов при анализе свойств сорбентов и полученных данных открывает новые возможности для синтеза композиционных сорбентов с комплексом заданных свойств. Показано, что ПАНИ и полиарамида демонстрируют сходные сорбционные свойства при взаимодействии с нуклеиновыми кислотами, но в разной степени удерживают белки. В нейтральной водной среде, оптимальной для разделения смесей биополимеров, полиарамида, хотя и не удерживали ДНК, имели меньшее сродство к белкам по сравнению с ПАНИ. Выход ДНК после пропускания образцов через слой частиц ПАНИ-модифицированного кремнезема оказался максимальным по сравнению с сорбентами, модифицированными полиарамидами. Таким образом, ПАНИ-содержащие композиты предпочтительны в качестве носителей для одностадийного выделения нуклеиновых кислот из сложных биологических смесей. В статье цитируются результаты систематических исследований авторов статьи по разработке сорбентов для одностадийного выделения биополимеров из сложных биологических смесей.*

**Ключевые слова:** полианилин, полиарамида, фторполимеры, композиционные сорбенты, интерферометрия, одностадийное выделение ДНК, нуклеиновые кислоты, белки, жидкостная хроматография, зондовая микроскопия, рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия

## STATIC AND DYNAMIC SORPTION OF NUCLEIC ACIDS AND PROTEINS ON SURFACE OF SORBENTS MODIFIED WITH NANOLAYERS OF POLYMERS

D.-J. Liaw, D.I. Zybin, A.I. Prostyakova, E.Yu. Yagudaeva, A.A. Vikhrov, A.A. Ishchenko, V.P. Zubov, D.V. Kapustin

*Sorption properties of composite silica sorbents modified with nanolayers of fluoropolymers, polyanilines and polyaramides containing aromatic nitrogen, fluorine, as well as donor and acceptor fragments, with respect to nucleic acids (DNA and RNA) and proteins differing in molecular weight and pI are considered. The use of the investigated sorbents in the sample preparation for molecular diagnostics (in particular, in the PCR analysis) not only provides a one-step isolation of nucleic acids, but also allows the isolation and simultaneous purification of protein compounds from the impurities presented in the initial mixture. For the first time, the properties of these materials are compared in the static sorption regime using the compact spin-columns and in the regime of dynamic sorption by the method of spectral-correlation interferometry. The effect of the chemical composition, morphology, and surface charge of these polymer coatings on their sorption properties was studied. Possible mechanisms of sorption of biopolymers on the investigated sorbents are discussed. The use of the developed approaches to the analysis of properties of the sorbents as well as the obtained data open new possibilities for the synthesis of composite sorbents with specific properties. PANI and polyaramides were shown to demonstrate the similar sorption properties when interacting with nucleic acids, but they differ in a various extent in the retention of various proteins. In a neutral aqueous medium (optimal for separation of biopolymers) polyaramides, although did not retain DNA, had a weaker affinity to proteins as compared to PANI. Since the recovery of DNA passed through the PANI-coated silica was the maximal among the particulate adsorbents, the PANI-modified composites were preferred as the carriers for the single-step isolation of nucleic acids from complex biological mixtures. The article cites the results of systematic studies of the authors in the development of sorbents for one-step separation and isolation of biopolymers from complex biological mixtures.*

**Key words:** polyaniline, polyaramides, fluoropolymers, composite sorbents, interferometry, one-step DNA isolation, nucleic acids, proteins, liquid chromatography, probe microscopy, X-ray photoelectron spectroscopy



**Дер-Джанг Льяо**

Отдел химической инженерии, Национальный Тайваньский университет науки и технологии, Тайпей, Тайвань, 10607, E-mail: liawdj@gmail.com

Область научных интересов: Синтез и характеристика функциональных полимерных материалов и высокоэффективных полимеров, получаемых методом прецизионной полимеризации.

**Der-Jang Liaw**

Department of Chemical Engineering, National Taiwan University of Science and Technology, Taipei, 10607, Taiwan, E-mail: liawdj@gmail.com

Field of research interests: Synthesis and characterization of functional polymer materials and high performance polymers via precision polymerization.



**Дмитрий Игоревич Зыбин**

Кафедра аналитической химии, Институт тонких химических технологий, Московский технологический университет, просп. Вернадского, 86, Москва, Российская Федерация, 119571

E-mail: ilooli95@gmail.com

Область научных интересов: Синтез композиционных сорбентов для выделения биополимеров из биологических смесей сложного состава. Оптимизация инструментальных аналитических методов для идентификации компонентов сложных биологических смесей. ВЭЖХ биологически активных соединений и их производных.

**Dmitry I. Zybin**

Department of Analytical Chemistry, Moscow University of Technology, Institute of Fine Chemical Technologies, Vernadskogo ave., 86, Moscow, 119571, Russia, E-mail: ilooli95@gmail.com

Field of research interests: Synthesis of composite sorbents for the isolation of biopolymers from biological mixtures of complex composition. Optimization of instrumental analytical methods for identification of components of complex biological mixtures. HPLC of biologically active compounds and their derivatives.



**Анна Игоревна Простякова**

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, Российская Федерация, 117997, E-mail: profan@list.ru  
Область научных интересов: Разработка и синтез композиционных полимерных материалов и полимеров медицинского назначения; разработка протоколов выделения и очистки белков, пептидов и ДНК для высокоточных методов анализа биополимеров; разработка полимерных имплантатов нового поколения.

**Anna I. Prostyakova**

M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, Miklukho-Maklaya st., 16/10, Moscow, 117997, Russia, E-mail: profan@list.ru  
Field of research interests: Development and synthesis of composite polymeric materials and polymers of medical purpose; development of protocols for the isolation and purification of proteins, peptides, and DNA for high-precision methods for the analysis of biopolymers; development of polymer implants of a new generation.



**Елена Юрьевна Ягудаева**

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, Российская Федерация, 117997  
E-mail: elena-yagudaeva@yandex.ru

Область научных интересов: Разработка новых методов получения и использования композиционных полимерсодержащих материалов для иммобилизации, выделения, концентрирования и очистки биополимеров, прежде всего нуклеиновых кислот и белков.

**Elena Yu. Yagudaeva**

M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, Miklukho-Maklaya st., 16/10, Moscow, 117997, Russia  
E-mail: elena-yagudaeva@yandex.ru  
Field of research interests: Development of new methods for obtaining and use of composite polymer-containing materials for immobilization, isolation, concentration and purification of biopolymers, especially nucleic acids and proteins.



**Александр Анатольевич Вихров**

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, Российская Федерация, 117997  
E-mail: sorb9@yandex.ru

Область научных интересов: Разработка методов получения биочипов для on-line систем биоконтроля и биомониторинга. Разработка и получение биосовместимых биodeградируемых материалов медико-биологического назначения.

**Alexander A. Vikhrov**

M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, Miklukho-Maklaya st., 16/10, Moscow, 117997, Russia, E-mail: sorb9@yandex.ru  
Field of research interests: Development of methods for obtaining of biochips for biocontrol and biomonitoring on-line systems. Development and production of biocompatible biodegradable materials for medical and biological purposes.



**Анатолий Александрович Ищенко**

Кафедра аналитической химии, Институт тонких химических технологий, Московский технологический университет, просп. Вернадского, 86, Москва, Российская Федерация, 119571,  
E-mail: aischenko@yasenevo.ru

Область научных интересов: Строение молекул, физико-химические методы исследования и анализа, в том числе электронография. Определение молекулярные параметров молекул. Создание новых методов дифракционных измерений. Когерентная внутримолекулярная динамика фотовозбужденных систем; структура и динамика переходного состояния; создание селективных сенсоров; нанокompозитные материалы, позволяющие управлять спектральным составом прошедшего электромагнитного излучения в УФ-области спектра; спектральный анализ нанокompозитных материалов.

**Anatoly A. Ishchenko**

Department of Analytical Chemistry, Moscow University of Technology, Institute of Fine Chemical Technologies, Vernadskogo ave., 86, Moscow, 119571, Russia, E-mail: aischenko@yasenevo.ru  
Field of research interests: The structure of molecules, physical and chemical methods of research and analysis, including electron diffraction. Determination of molecular parameters of molecules. Creation of new methods of diffraction measurements. Coherent intramolecular dynamics of photoexcited systems; structure and dynamics of the transition state; creation of selective sensors; nanocomposite materials providing a control of the spectral composition of the transmitted electromagnetic radiation in UV region of spectrum; spectral analysis of nanocomposite materials.



**Виталий Павлович Зубов**

Кафедра химии и технологии высокомолекулярных соединений, Институт тонких химических технологий, Московский технологический университет, просп. Вернадского, 86, Москва, Российская Федерация, 119571

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, Российская Федерация, 117997

E-mail: zubov@ibch.ru

Область научных интересов: Разработка новых полимерсодержащих материалов для медицинской диагностики и биосепарации, в частности на основе полимеризации в адсорбционных слоях неорганических матриц.

**Vitaly P. Zubov**

Department of Chemistry and Technology of Macromolecular Compounds, Moscow University of Technology, Institute of Fine Chemical Technologies, Vernadskogo ave., 86, Moscow, 119571, Russia

M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, Miklukho-Maklaya st., 16/10, Moscow, 117997, Russia

E-mail: zubov@ibch.ru

Field of research interests: Development of new polymer-containing materials for medical diagnostics and bioseparation, in particular on the basis of polymerization in adsorption layers of inorganic matrices.



**Дмитрий Валерьевич Капустин\***

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, Российская Федерация, 117997

E-mail: kapustin@ibch.ru\*

Область научных интересов: Синтез композиционных сорбентов для выделения биополимеров из биологических смесей сложного состава; гибридные материалы, выделение и очистка биомолекул, полимераналогичные превращения, ПЦР- и неинвазивная диагностика, биodeградируемые полимеры и имплантаты. Исследование механизмов сорбции биомакромолекул (нуклеиновые кислоты, белки) на поверхности сорбентов, модифицированных полианилином, полиарамидами и фторополимерами. Разработка полимерных подложек для масс-спектрометрии. Разработка биоразлагаемых полимерных композиций и способов введения биосовместимых рентгеноконтрастных и лекарственных веществ в состав имплантатов.

**Dmitry V. Kapustin\***

M.M. Shemyakin & Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of RAS, Miklukho-Maklaya st., 16/10, Moscow, 117997, Russia

E-mail: kapustin@ibch.ru\*

Field of research interests: Synthesis of composite sorbents for isolation of biopolymers from biological mixtures of complex composition; hybrid materials, isolation and purification of biomolecules, polymer-analogical reactions, PCR- and non-invasive diagnostics, biodegradable polymers and implants. Investigation of sorption mechanisms of biomacromolecules (nucleic acids, proteins) on the surface of sorbents modified with polyaniline, polyaramides and fluoropolymers. Development of polymer substrates for mass spectrometry. Development of biodegradable polymer compositions and methods for introducing of biocompatible radiopaque and drug substances into the composition of implants.

**Для цитирования:**

Льяо Д.-Дж., Зыбин Д.И., Простякова А.И., Ягудаева Е.Ю., Вихров А.А., Ищенко А.А., Зубов В.П., Капустин Д.В. Статическая и динамическая сорбция нуклеиновых кислот и белков на поверхности сорбентов, модифицированных нанотолщинными слоями полимеров. *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2018. Т. 61. Вып. 1. С. 4–22

**For citation:**

Liaw D.-J., Zybin D.I., Prostyakova A.I., Yagudaeva E.Yu., Vikhrov A.A., Ishchenko A.A., Zubov V.P., Kapustin D.V. Static and dynamic sorption of nucleic acids and proteins on surface of sorbents modified with nanolayers of polymers. *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* 2018. V. 61. N 1. P. 4–22

**ВВЕДЕНИЕ**

Относительно новым и быстро развивающимся разделом современной биотехнологии стала *молекулярная биотехнология*, одно из направлений которой основывается на разработке и применении молекулярно-генетических и иммуноаналитических методов в лабораторной диагностике инфек-

ционных заболеваний [1]. Во многом это произошло благодаря открытию процесса искусственного многократного копирования ДНК, известного как полимеразная цепная реакция (ПЦР) [2]. Широкое использование методов *молекулярной диагностики* в практике исследовательских и клинических лабораторий определяет постоянно растущую потребность в удовлетворительно очищенных препаратах

нуклеиновых кислот (НК) и белков. Мировой рынок *in-vitro* диагностики, по ряду оценок, в 2017 г. уже составляет более 70 миллиардов долларов США, причем на долю рынка диагностикумов на основе тестирования НК приходится 15% от общего объема, и эта доля продолжает увеличиваться.

ПЦР-анализ отличается исключительно высокой чувствительностью и селективностью, однако серьезной проблемой при ПЦР-диагностике остается выбор конкретных способов подготовки клинических образцов к исследованию, поскольку до последнего времени не существовало универсального подхода к выделению НК разных видов организмов из различных биологических источников. Сказанное также относится и к разделению смесей веществ белковой природы, прежде всего ферментов и биологически активных пептидов, поскольку присутствие различных примесей в выделенном образце может существенно снизить эффективность их применения в медицинской диагностике, биоинженерии или в качестве компонентов лекарственных средств (в том числе, вакцин).

Большинство известных методов разделения смесей биополимеров (основанных на жидкостной экстракции [3], осаждении [4, 5] или адсорбции с применением различных сорбентов [6, 7]) многостадийны, трудоемки и часто сопровождаются потерями выделяемого компонента. Это связано с тем, что эти методы основаны на концепции «улавливания» и удерживания целевого биополимера сорбентом на первом этапе разделения, за которым необходимо осуществлять дополнительные этапы отмывки от примесей и элюцию целевого компонента с поверхности (или из объема пор) сорбционного материала. Несмотря на то, что такой многостадийный механизм широко применяется на практике, весьма актуальной является проблема разработки альтернативной практической методологии, обеспечивающей реализацию одностадийной схемы выделения целевого продукта, в результате чего выделяемый (а заодно и очищаемый) биополимер после нанесения смеси на сорбент, не удерживаясь, выходит в исключенном объеме, а примеси удерживаются сорбентом. Такой подход выглядит естественным, однако до сих пор было обнаружено, что только относительно небольшое число синтетических полимеров проявляют необходимую селективность, обеспечивающую одностадийное разделение смесей НК и белков.

Результаты проводимых в последние годы исследований позволяют говорить об особой группе фторполимер- и полианилинсодержащих материалов, обеспечивающих одностадийное разделение компонентов смесей, содержащих НК

и/или белки с одновременной их очисткой от присутствующих в исходной смеси примесей. В силу своих физико-химических свойств ни фторполимеры, ни полианилины (ПАНИ) не пригодны для получения пористых сорбентов с удовлетворительными механическими характеристиками. Выход был найден в получении композиционных материалов, объединяющих жесткость и контролируемую пористость твердой подложки с уникальными сорбционными свойствами полимерного модификатора. Такой подход позволяет сочетать в одном материале преимущества неорганических и органических полимерных материалов. Поверхность такого материала будет вести себя как соответствующий полимер, а жесткость и пористость сорбента определяются исходной неорганической матрицей. *Прямой синтез* таких нанокмозитов предполагает, что реакции синтеза макромолекул будут совмещаться с образованием сплошных однородных нанотолщинных полимерных покрытий, прочно связанных с поверхностью носителя, в том числе на внутренней поверхности пор носителя с сохранением его исходной структуры.

Капустиным и Зубовым с соавт. разработан ряд технологий, обеспечивающих получение композиционных сорбентов, модифицированных фторполимерами и ПАНИ, отличающихся воспроизводимыми морфологическими характеристиками, высокой гидролитической стабильностью и селективностью при разделении смесей НК и белков [8-11]. Можно привести многочисленные примеры удачного практического применения таких сорбентов при выделении НК и/или белков из проб, различающихся по происхождению (вирусы, прокариоты, эукариоты), источнику (бактериальные культуры, биологические жидкости, ткани растений и животных, почва, пищевые продукты и др.) и способу подготовки (лизаты, экстракты, фильтраты и пр.) [12-17].

Как оказалось, несмотря на очевидные различия в химической структуре фторполимеров и ПАНИ, материалы, поверхность которых модифицирована этими полимерными модификаторами, проявляют сходные сорбционные свойства в отношении белков и НК. В результате контакта с поверхностями таких материалов белковые молекулы (или пептиды) эффективно (как правило, обратимо) сорбируются, в то время как двунитевые ДНК (днДНК) не удерживаются, а РНК или однонитевые НК удерживаются в различной степени (но слабее, чем белки) в зависимости от содержания одностебельных и двустебельных участков в макромолекуле. Материалы, обладающие такими сорбционными свойствами, позволяют разделять НК и



белки в одну стадию, быстро и легко получать очищенные препараты НК, выделяемые из сложных биологических образцов. Очевидно, что механизм сорбции биополимеров различного строения на полимерсодержащих сорбентах, обеспечивающий указанный «благоприятный» протокол проведения «биосепарации», требует специального изучения, что позволит проводить целенаправленный выбор сорбентов для решения конкретных задач в области молекулярной биотехнологии.

Авторы данной работы проводили систематические комплексные исследования сорбционных свойств ряда полимер-модифицированных материалов с целью сравнительной оценки факторов, определяющих механизм сорбции различных биополимеров на их поверхности, таких как химическая структура полимерного модификатора, морфология и заряд поверхностного слоя полимерного покрытия, структура выделяемого биополимера, состав пробы и т.д.

В статье обобщены результаты, анализ которых позволяет оценить, в какой степени введение различных функциональных групп в состав полимерных модификаторов оказывает влияние на сорбционные свойства получаемых композитов и установить, насколько уникальны сорбционные свойства фторполимеров и ПАНИ, демонстрируют ли подобные свойства и другие полимеры. Полученные данные также позволяют заранее с высокой степенью достоверности оценивать эффективность применения композиционного сорбента известного состава для решения конкретной практической задачи, а также расширить область применения получаемых материалов в исследовательской практике и в клинической диагностике.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. *Сходство и различия в сорбционных свойствах фторполимерных и ПАНИ-покрытий.* Прежде, чем перейти к обсуждению результатов комплексного исследования сорбционных свойств фтор- и анилинсодержащих сорбентов при разделении компонентов биологических смесей, мы кратко проиллюстрируем наиболее общие свойства этих материалов на примере разделения компонентов биологической смеси, содержащей ДНК, РНК и белки, а также рассмотрим условия разделения удерживаемых при этом компонентов белковой фракции. Предложенный принцип одностадийного хроматографического разделения компонентов биологических смесей, содержащих НК и белки, наглядно демонстрируют примеры исполь-

зования ВЭЖХ-колонок, упакованных политетрафторэтилен (ПТФЭ)- и ПАНИ-содержащими кремнеземными сорбентами при разделении смеси, содержащей плазмиду pBR 322 из *E. Coli*, РНК и сопутствующие белки (рис. 1) [18]. На рис. 1 видно, что ДНК выходит с ПТФЭ-колонок в первой фракции в исключенном объеме, РНК слабо удерживается, но также выходит в изократическом режиме в составе второй фракции. Суммарная белковая фракция может быть полностью десорбирована с колонки только в условиях возрастающего градиента концентрации органического растворителя в режиме обращено-фазовой ВЭЖХ аналогично тому, как это происходит при использовании С18-фаз. Белки при этом элюируются тем быстрее, чем меньше их молекулярная масса (рис. 2а).

Сходным образом ведут себя ПАНИ-кремнеземы. Однако рН-чувствительность ПАНИ-покрытия, определяемая наличием системы полисопряжения в структуре макромолекулы ПАНИ, в свою очередь определяет и иной механизм удерживания белков (пептидов), в результате чего белки выходят с колонки в условиях понижающегося градиента рН в зависимости от значения их изоэлектрической точки (но не молекулярной массы; рис. 2б). Этот эффект обеспечивает ощутимое преимущество при разделении белковых смесей по сравнению с фторполимерсодержащими сорбентами, т.к. в этом случае не требуется добавлять органические компоненты в подвижную фазу.

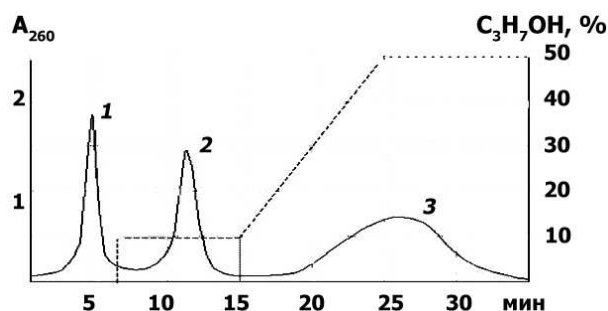


Рис. 1. Очистка плазмиды pBR322 от РНК и сопутствующих белков на колонке, упакованной носителем Trisopor™-500, модифицированным ПТФЭ (250 x 4.6 мм) (сорбент получен методом радиационной постполимеризации тетрафтор-этилена в присутствии носителя) [18]. Элюент: 0,01M Tris-HCl (рН 7,5-8,2). Градиент: 0-50% пропанола, 20 мин. Скорость элюции: 100 мкл/мин. 1 - Плазмида, 2 - РНК, 3 - белки  
 Fig. 1. Purification of pBR322 plasmid from RNA and accompanying proteins on a column packed with a Trisopor™-500 support modified with PTFE (250 x 4.6 mm) (the sorbent was prepared by radiation post-polymerization of tetrafluoroethylene in the presence of a support) [18]. Eluent: 0.01M Tris-HCl (pH 7.5-8.2). Gradient: 0-50% propanol, 20 min. Elution rate: 100 µl/min. 1 - Plasmid, 2 - RNA, 3 - proteins

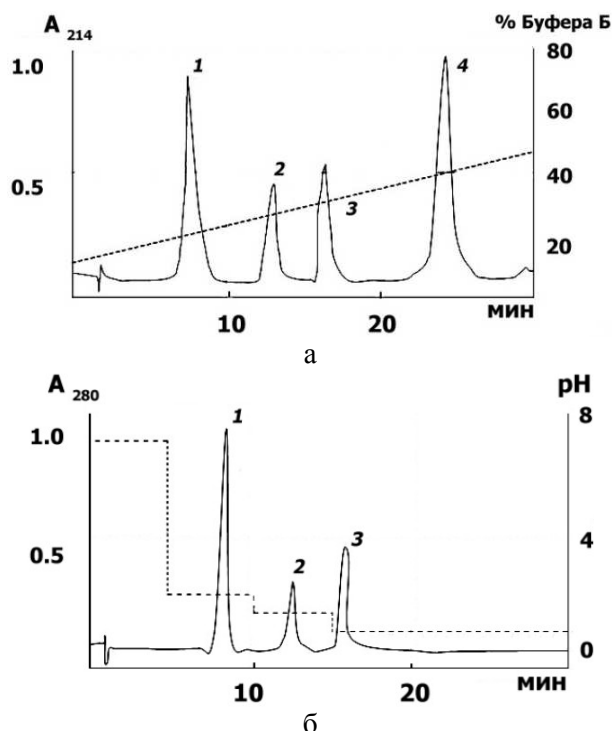


Рис. 2. (А) Разделение компонентов белковой смеси, содержащей  $\beta$ -эндорфин (1), лизоцим (2), цитохром С (3) и яичный альбумин (4) на колонке, упакованной носителем Trisopor<sup>TM</sup>-500, модифицированным ПТФЭ (250 x 4,6 мм). Скорость элюции: 1,0 мл/мин. Буферный раствор А: 0,1% ТФУ, буферный раствор В: 90% ацетонитрил в буферном растворе А. Градиент: 10 – 50% буферного раствора В в течение 30 мин [18]. (Б) Разделение смеси белков на колонке (150 x 5 мм), упакованной МПС-1150, модифицированным ПАНИ, в градиенте рН (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) [19]

Fig. 2. (A) Separation of components of a protein mixture containing  $\beta$ -endorphin (1), lysozyme (2), cytochrome C (3) and egg albumin (4) on a column packed with Trisopor-500 support modified with PTFE (250 x 4.6). Elution rate: 1.0 ml/min. Buffer solution A: 0.1% TFA, buffer solution B: 90% acetonitrile in buffer A. Gradient: 10 - 50% buffer B for 30 minutes [18]. (B) Separation of a mixture of proteins on a column (150 x 5 mm) packed with CPG-1150 modified with PANI in a pH gradient (7.0 - 1.0): elution rate: 0.25 ml/min; solution A - deionized water; solution B - 0.015 M aqueous hydrochloric acid; gradient: 0 - 55% solution B for 30 min. 1 - Lysozyme (pI = 11, Rt = 10.9); 2 - myoglobin (pI = 7, Rt = 12.5); 3 - cytochrome C (pI = 5.6, Rt = 14.3) [19]

Еще одним примером удачного использования в биоаналитических целях полимерных покрытий на основе полимеров, содержащих анилиновые звенья, может служить разработка покрытий сополимера анилина с 3-аминобензойной кислотой на кремниевых пластинах (чипах) для непосредственного применения в качестве рабочих поверхностей в масс-спектрометрии [20].

Для демонстрации эффекта разделения смесей белков на таких модифицированных пластинах проводили предварительные эксперименты с модельными смесями меченых белков. Для визуализации удерживания белков был разработан простой наглядный способ, при котором белки с различными значениями pI метили люминисцентными (с эмиссией при 546 и 581 нм) полупроводниковыми нанокристаллами. Растворы индивидуальных меченых белков (с концентрацией 0,5 мг/мл), а также их смесь в виде капель наносили на модифицированную ПАНИ-м-АБК поверхность кремниевого чипа и выдерживали 5 мин при комнатной температуре. Избыток жидкости удаляли, промывая пластинку буферным раствором с соответствующим рН, сорбцию визуализировали в УФ-свете. Результаты визуализации подтвердили, что разделение белков (пептидов) в зависимости от значений их pI можно проводить непосредственно на кремниевых пластинах, модифицированных анилин-содержащим сополимером, используя подходящий буферный раствор с требуемым значением рН (в зависимости от кислотно-основных свойств определяемого методом масс-спектрометрии компонента разделяемой смеси, остающегося на пластине).

Таким образом, если на этапе разделения фракций НК и белков композиционные сорбенты с фторполимерным и ПАНИ-покрытием демонстрируют похожие сорбционные свойства, то десорбция компонентов белковой фракции, очевидно, происходит по различным механизмам, определяемым особенностями химической структуры использованных полимерных модификаторов.

2. *Объекты исследования и основные характеристики исследуемых полимерных покрытий.* Следует отметить, что традиционная колоночная хроматография является относительно медленным процессом и требует применения высоких давлений и специального оборудования. Высокая сорбционная емкость и селективность фторполимер- и ПАНИ-модифицированных сорбентов позволяют использовать компактные спин-колонки. При этом можно разделять НК и белки в одну стадию, не изменяя состав элюента (или даже в отсутствие такового в случае, если на спин-колонку наносится достаточный объем образца). При необходимости белковая фракция также может быть элюирована подходящим буфером. Основную часть обсуждаемых в данной работе исследований проводили с использованием именно таких спин-колонок, содержащих синтезированные сорбенты.

С целью сбора данных, позволяющих судить о вероятных механизмах сорбции биополимеров на полученных материалах, и для ответа на вопрос: присущи ли сорбционные свойства фторполимеров и ПАНИ другим классам полимеров, в работе исследовали свойства модельных сорбентов, полученных на основе частиц объемно-пористого кремнезема, на поверхность которых наносили исследуемые полимерные покрытия. Эти сорбенты получали методом spin-coating, используя серию полиарамидов с закономерно меняющейся струк-

турой, содержащих набор «ключевых» элементов (ароматический азот, фтор, а также донорные и акцепторные фрагменты). Их свойства сравнивали со свойствами фторполимер- и ПАНИ-содержащих сорбентов, полученных по методикам, приведенным в [17] и [13], соответственно. Химические структуры полиарамидов, любезно предоставленных для исследования коллегами из Тайваньского университета, а также структуры фторполимера (фторопласта 42 Л) и ПАНИ приведены в табл. 1.

Таблица 1

Использованные полимерные модификаторы  
Table 1. The list of the used polymer modifiers

Обозначение полимерного модификатора	Химическая структура
Повторяющийся элемент в структуре полиарамидов	
РА1	
РА7	
РА8	
РА11	
ФП	
ПАНИ	
ПТФЭ	

Образцы всех полученных в работе сорбентов исследовали методами ртутной порометрии (для оценки изменений в морфологии поверхности носителя после модифицирования полимерами) и элементного анализа (для определения доли полимерного компонента в составе композита). Также оценивали устойчивость полученных композитов в

условиях щелочного гидролиза материала носителя (с целью качественной оценки сплошности полимерного покрытия). Полученные данные сведены в табл. 2. Видно, что во всех полученных материалах в значительной степени сохраняется пористость исходного носителя, в то время как средний диаметр пор несколько уменьшается за счет



образования полимерного покрытия. Тот факт, что покрытие образуется не только на внешней поверхности частиц носителя, но и на внутренней поверхности пор, подтверждается одновременным сопоставимым уменьшением удельного объема и среднего эффективного диаметра пор.

Равномерность и сплошность распределения полимерного покрытия косвенно подтверждается данными о высокой стойкости модифицированного кремнезема в условиях гидролиза силоксановых связей Si-O-Si по сравнению с немодифицированным кремнеземом в сильнощелочной среде.

Эффект экранирования неорганической поверхности полимерной фазой особенно заметно проявляется в первые 70 мин процесса.

Полученные данные позволяют утверждать, что в результате обработки поверхности объемно-пористого кремнеземного носителя исследуемыми полимерными модификаторами во всех случаях формируется малодефектное и равномерно распределенное полимерное покрытие, причем пористость исходного носителя в значительной степени сохраняется.

Таблица 2

**Характеристики полимерного покрытия в образцах полученных композитов**  
**Table 2. Characteristics of the polymer coating in samples of the obtained composites**

Носитель-полимерный модификатор	Уменьшение среднего эффективного диаметра пор носителя после модификации, нм	Средняя эффективная толщина покрытия, нм	Доля полимерного покрытия в составе композита, %	Отношение скоростей растворения кремнезема в 0,01M NaOH в образцах исходного носителя и сорбента
Si-500-ФП	6	3	10	8
Si-500-ПАНИ	7	3,5	25	10
Si-500-ФП-ПАНИ	15	7,5	35	23
Si-500-РА1	7	3,5	15	10
Si-500-РА7	8	4	20	9
Si-500-РА8	7	3,5	15	11,5
Si-500-РА11	4	2	7	6

### 3. Сорбционные свойства полученных материалов в отношении нуклеиновых кислот и белков.

Параллельно решились две задачи. Во-первых, было важно обобщить и сравнить данные, полученные при исследовании сорбционных свойств полимерсодержащих сорбентов в режиме статической сорбции (протекающей в результате контакта компонентов смеси после пропитки неподвижного слоя сорбента аликвотой образца, содержащей биополимер или их смесь) и в режиме динамической сорбции (при пропускании образца над поверхностью пластины, предварительно покрытой слоем исследуемого полимера). В первом случае данные получали методами спектрофотометрического и электрофоретического анализа. Во втором случае формирование адсорбционного слоя на пластине регистрировали в режиме реального времени методом спектрально-корреляционной интерферометрии (СКИ) [21, 22].

Во-вторых, данные, полученные при различных режимах сорбции биополимеров, могут сильно различаться, поэтому было необходимо проанализировать причины этих различий, сопоставляя результаты исследования сорбции с данными о составе и морфологии исследованных покрытий.

Очевидно, что сорбционные свойства сорбента могут определяться как химической структурой макромолекул поверхностного слоя, так и особенностями его поверхностной морфологии. В зависимости от природы функциональных групп, содержащихся на поверхности сорбента, их полярности, донорно-акцепторных свойств, эффективность сорбции НК и белков будет определяться реальной химической природой поверхностного слоя сорбента (которая может не совпадать с брутто-формулой полимерного модификатора), обуславливающей реализацию различных механизмов сорбции. От морфологии поверхностного слоя сорбента может зависеть не только сорбционная емкость, но и степень влияния материала подложки на сорбционные свойства (в случае сквозных пор в полимерном покрытии или при отсутствии сплошного покрытия), а также наличие молекулярно-ситового эффекта. Поэтому необходимо по отдельности оценивать оба этих фактора.

*3.1. Химический состав, морфология и заряд поверхностного слоя исследованных сорбентов.* Методология определения химического состава поверхностного слоя полимерных покрытий подробно описана в [23]. Элементный состав поверхностного слоя исследуемых полимерных по-

крытий определяли методом рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) и сравнивали с составом, соответствующим брутто-формуле полимерного модификатора. Было найдено, что во всех полиарамидсодержащих образцах теоретически рассчитанные и экспериментально определенные атомные доли углерода, азота, фтора и серы примерно совпадают, различаясь в пределах ошибки метода. Полученные результаты позволяют сделать заключение о соответствии реальных химических структур поверхностных слоев брутто-формулам использованных полимерных модификаторов. Некоторые полученные покрытия неравномерны по толщине и характеризуются наличием пористости, что подтверждается данными сканирующей зондовой микроскопии [23], табл. 3. Так, при анализе рельефа образца РА8 явно определяются сквозные поры в толще покрытия, а на соответствующих изображениях определяется объемно-пористая структура. Покрытия РА1 и РА7 также заметно изменяются по толщине и имеют пористую структуру, хотя поры в этом случае несквозные. ФП-покрытие имеет относительно ровную поверхность без сквозных пор, как и ПАНИ-покрытие. В случае ФП-ПАНИ-образца на поверхности предварительно полученного слоя фторопласта формируется значительно более гладкое ПАНИ-покрытие, чем при полимеризации анилина в отсутствие фторполимера. В целом, поверхность полимерных покрытий, получаемых химическими методами, оказывается значительно более гладкой по сравнению с покрытиями, полученными нанесением из готовых растворов полимеров. Таким образом, морфология поверхности и эффективная толщина полученных полимерных покрытий существенно различаются.

В табл. 3 также приведены  $\xi$ -потенциалы поверхности частиц полученных сорбентов. Видно, что все исследованные полиарамидсодержащие материалы имеют крайне слабый положительный заряд (1,5-5 мВ), несколько сильнее он выражен у ФП-материала (10 мВ) и у ПАНИ-содержащих сорбентов ( $30 \pm 2$  мВ), что предполагает наличие у них слабо выраженных анионообменных свойств.

### 3.2. Удерживание нуклеиновых кислот и белков исследованными сорбентами.

Сорбция растворенного вещества на твердой поверхности может протекать как в статических, так и в динамических условиях. Применительно к условиям нашего исследования, сорбцию следует считать статической, если вещество, находящееся в неподвижной жидкой фазе, удержива-

ется в результате контакта с сорбентом. В этом случае *статическая активность сорбента* характеризуется количеством удерживаемого вещества на единицу массы сорбента к моменту достижения равновесия при неизменных температуре жидкости и начальной концентрации растворенного вещества. Динамическая сорбция происходит в том случае, когда удерживаемое вещество находится в подвижной жидкой фазе, которая пропускается над исследуемой полимерной поверхностью. Тогда *динамическую активность покрытия* в первом приближении проще всего охарактеризовать временем от начала пропускания сорбата до насыщения формируемого адсорбционного слоя. Очевидно также, что скорость формирования и толщина образуемого адсорбционного слоя будут зависеть и от природы сорбата.

#### 3.2.1. Удерживание биополимеров в режиме статической сорбции.

Вначале рассмотрим данные, полученные в результате статической сорбции биополимеров при смачивании, инкубировании и дальнейшем пропускании соответствующих растворов модельных биополимеров или их смесей через картриджи, содержащие исследуемые сорбенты. Дополнительно для оценки эффективности выделения ДНК из сложной биологической смеси через картриджи пропускали клеточные лизаты *E. coli* и *Agrobacterium tumefaciens* C58, содержащие ДНК, РНК, белки, прочие компоненты разрушенных клеток, соли и детергенты, а затем анализировали полученные элюаты спектрофотометрически, электрофоретически и методом ПЦР. Сорбционные свойства полимер-модифицированных кремнеземов исследовали с помощью растворов и смесей модельных биополимеров, содержащих бычий сывороточный альбумин (БСА), лизоцим, пепсин, цитохром С, фрагменты ДНК различной длины, бактериальную геномную ДНК, дрожжевую тРНК, а также лизаты бактериальных культур *E. coli* и *Agrobacterium tumefaciens* C58. Характеристики биополимеров представлены в табл. 3.

В первой части табл. 4 приведены спектрофотометрические данные о выходе ДНК и РНК, а также сорбционная емкость сорбентов по белкам, различающимся молекулярной массой и значениями рI.

Можно видеть, что для всех четырех исследованных полиарамидсодержащих материалов характерно незначительное удерживание ДНК. Несмотря на то, что содержание двунитевой ДНК (днДНК) в элюате несколько различается между

Таблица 3

Использованные биополимеры  
Table 3. The list of the used biopolymers

Биополимер	Мм, кДа	pI	Молярная гидрофобность, кДж/моль*
БСА	~66,5	4,8	1130
Пепсин	~34,6	2,2	865
Лизоцим	~14,4	11,3	306
Цитохром С	~12	10,6	не определено
тРНК из пекарских дрожжей, тип X	~25	-	-
ДНК-линейка: смесь фрагментов от 75 до 20000 п.о.	52-13800**	-	-
днДНК из <i>E. coli</i>	~2760 (4000 п.о.)*	-	-
днДНК из <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58	~13800 (20000 п.о.)*	-	-

Примечание: \* см. раздел 3.2.2. \*\* Средняя молекулярная масса одного нуклеотида принимается равной 345

Note: \* see section 3.2.2. \*\* average molecular weight of one nucleotide is taken equal to 345

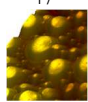
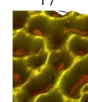
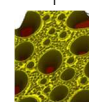
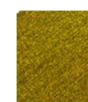
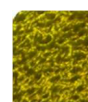
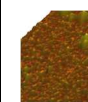
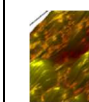
отдельными образцами, это различие не превышает 15%. Максимальная концентрация днДНК (75% от количества в исходном растворе) определена в элюатах, полученных при использовании пары сорбентов, содержащих наряду с трифторметильными также электроноакцепторные группы. Несколько более высокое содержание днДНК в составе исключенного объема (80%) по сравнению с сорбентами, покрытыми полиарамидами, наблюдали для ФП-ПАНИ-содержащего материала. Напротив, выход днДНК с ФП-содержащего сорбента на 6-18% ниже, чем с остальных образцов.

РНК, имеющая в своей структуре как дву-нитевые, так и одонитевые последовательности, удерживается полиамидсодержащими материалами значительно сильнее, чем днДНК. В меньшей степени – до 70% – РНК удерживают материалы PA1 и PA7, в то время как сорбенты, модифицированные полиарамидами PA11 и PA8, удерживают 85 и 93% РНК, соответственно. Для сравнения, на

Таблица 4

## Сорбционные свойства исследованных сорбентов

(численные данные представлены как средние значения  $\pm SD$ ,  $n = 3$ )Table 4. Sorption properties of the studied sorbents (numerical data are presented as mean values  $\pm SD$ ,  $n = 3$ )

Полимерный модификатор	PA1	PA7	PA8	PA11	ПТФЭ	ФП	ПАНИ	ФП-ПАНИ
Удерживание биополимеров								
Выход ДНК, %	74 $\pm$ 0,56	75 $\pm$ 0,57	60 $\pm$ 0,52	63 $\pm$ 0,51	67 $\pm$ 0,52	65 $\pm$ 0,42	71 $\pm$ 0,59	80 $\pm$ 0,84
Выход РНК, %	30 $\pm$ 0,33	30 $\pm$ 0,32	7 $\pm$ 0,18	15 $\pm$ 0,24	2 $\pm$ 0,08	7,0 $\pm$ 0,18	4 $\pm$ 0,12	5 $\pm$ 0,15
Емкость по белку, мг/г сорбента								
БСА	8,0 $\pm$ 0,21	8,0 $\pm$ 0,19	7,0 $\pm$ 0,16	7,0 $\pm$ 0,18	8,0 $\pm$ 0,20	7,0 $\pm$ 0,17	7,0 $\pm$ 0,17	7,0 $\pm$ 0,16
Пепсин	7,0 $\pm$ 0,18	6,5 $\pm$ 0,15	7,0 $\pm$ 0,17	7,0 $\pm$ 0,18	7,5 $\pm$ 0,19	7,0 $\pm$ 0,17	6,0 $\pm$ 0,12	6,0 $\pm$ 0,13
Цитохром С	8,0 $\pm$ 0,21	8,5 $\pm$ 0,18	7,5 $\pm$ 0,21	7,5 $\pm$ 0,19	8,0 $\pm$ 0,19	8,0 $\pm$ 0,20	9,0 $\pm$ 0,25	9,0 $\pm$ 0,21
Лизоцим	8,0 $\pm$ 0,20	8,4 $\pm$ 0,15	7,3 $\pm$ 0,25	7,5 $\pm$ 0,18	8,0 $\pm$ 0,20	8,0 $\pm$ 0,18	8,5 $\pm$ 0,25	9,0 $\pm$ 0,20
Отношение выходов ДНК/РНК	2,5	2,5	8,6	4,2	33,5	9,3	17,8	16,0
$A_{260}/A_{280}$ (смесь ДНК + БСА)*	1,5	1,7	1,2	1,2	1,5	1,1	1,4	1,9
* $A_{260}/A_{280}$ для смеси (ДНК + БСА) составляет 0,9								
Характеристики полимерного покрытия**								
$\xi$ -Потенциал, мВ	2,1 $\pm$ 0,63	2,3 $\pm$ 0,51	1,63 $\pm$ 0,39	5,34 $\pm$ 0,94	н/о	10,2 $\pm$ 0,63	32,0 $\pm$ 5,15	30,47 $\pm$ 0,96
Максимальная толщина покрытия, нм	1321,39	316,75	341,17	55,23	н/о	405,26	319,35	1016,66
Наличие сквозных пор в покрытии**	+/- 	+/- 	+ 	- 	н/о	- 	- 	- 
** + - сквозные поры, +/- - несквозные поры,								
Характеристики динамической сорбции биополимеров								
Продолжительность насыщения адсорбционного слоя, мин:								
БСА	2,0 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,2	н/о	н/о	0,8 $\pm$ 0,1	н/о
Лизоцим	7,0 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,2	н/о	н/о	0,8 $\pm$ 0,1	н/о
Пепсин	-	-	-	-	н/о	н/о	-	н/о
днДНК	-	-	-	-	н/о	н/о	-	н/о

Толщина адсорбционного слоя, нм								
БСА	1,0±0,1	1,5±0,15	1,4±0,15	2,1±0,2	н/о	н/о	1,7±0,2	н/о
Лизоцим	0,2±0,015	0,2±0,015	1,3±0,15	2,5±0,2	н/о	н/о	2,1±0,2	н/о
Пепсин	-	-	-	-	н/о	н/о	-	н/о
днДНК	-	-	-	-	н/о	н/о	-	н/о

сорбентах, модифицированных ПАНИ и ФП-ПАНИ, удерживается более 95% РНК, а на ПТФЭ-содержащем материале РНК удерживается практически полностью (98%).

Результаты электрофореза (рис. 3) элюатов, полученных после пропускания через картриджи раствора ДНК-фрагментов различной длины (от 75 до 2000 п.о.), а также после пропускания бактериального лизата *E. coli*, соответствуют данным табл. 4.

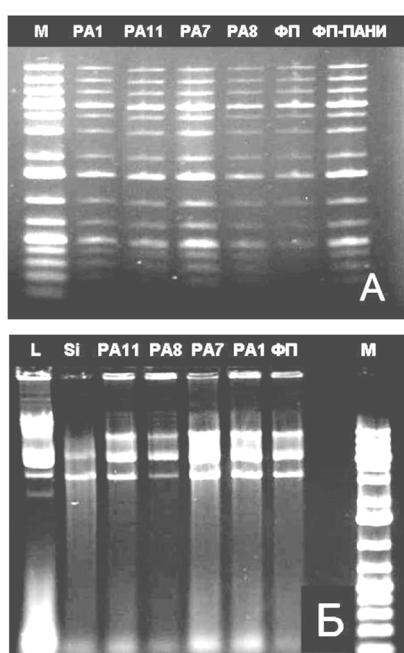


Рис. 3. Электрофорез в 0,8% агарозном геле (А) ДНК-фрагментов (1 kb DNA Ladder GeneRulerTM 75 - 20000 bp), содержащихся в полученных элюатах (М - исходный раствор ДНК-фрагментов, 1 мкл в 20 мкл образца, аббревиатуры над треками обозначают полимерный модификатор соответствующего модельного сорбента) и (Б) ДНК, выделенной из *E. coli* (L- лизат *E. coli*, PA11, PA8, PA7, PA1, FP-PANI - элюаты, полученные с использованием сорбентов, модифицированных соответствующими полиамидами и ФП, Si - исходный кремнезем, М - маркер ДНК, 1 kb DNA Ladder GeneRulerTM 75 - 20000 bp) [23]

Fig. 3. Electrophoresis in 0.8% agarose gel (A) of DNA fragments (1 kb DNA Ladder GeneRulerTM 75 - 20000 bp) contained in the resulting eluates (M is the initial solution of DNA fragments, 1 µl in 20 µl of a sample, the abbreviations above the tracks specify the polymer modifier of the corresponding model sorbent), and (B) of DNA isolated from *E. coli* (L-lysate of *E. coli*, PA11, PA8, PA7, PA1, FP-PANI are the eluates obtained using the sorbents modified with the corresponding polyaramides and FP, Si - pristine silica, M - DNA marker, 1 kb DNA Ladder GeneRulerTM 75 - 20000 bp) [23]

Таким образом, степень удерживания НК зависит от химической структуры полимерного модификатора и от третичной структуры сорбата, но не от молекулярной массы НК.

Из рис. 3 видно, что покрытия, содержащие электроноакцепторные группы (РА1 и РА7), по селективности к паре ДНК – РНК близки к ПАНИ-содержащим сорбентам, в то время как материалы с электронодонорными фрагментами (РА 8 и РА11) по этому показателю мало отличаются от ФП-содержащего материала.

Сравнивая выходы ДНК и РНК в элюатах, полученных с помощью исследованных сорбентов, можно видеть (табл. 4), что для перфторполимер- и ПАНИ-модифицированных сорбентов характерна более высокая степень очистки ДНК от РНК, когда содержание ДНК в элюате более, чем в 15 раз превышает содержание РНК (а в случае ПТФЭ-материала даже более, чем в 30 раз). Для остальных исследованных образцов сорбентов не достигается даже 10-кратное превышение, в том числе для материалов, модифицированных полимерами с низким содержанием атомов фтора (РА1 и РА7). Как было показано в ряде работ [10, 11, 14, 16, 17], степень очистки препаратов ДНК, выделенной из лизатов образцов, содержащих бактерии и вирусы, а также растительную ткань или кровь, с применением ПАНИ-содержащих сорбентов обеспечивает возможность их непосредственного использования в ПЦР-анализе. В работе [24] было продемонстрировано, что использование РА7-сорбента в пробоподготовке при ПЦР-анализе бактериальной ДНК (из *Agrobacterium tumefaciens* C58) также оказывается эффективным.

Далее было необходимо выяснить, насколько природа полимерного покрытия сорбента влияет на сорбцию белков. Для ответа на вопрос: какая из основных характеристик белкового сорбата (молекулярная масса или рI) сильнее сказывается на связывании белков поверхностью сорбента, через картриджи с исследуемыми сорбентами пропускали растворы индивидуальных белков, различающихся по этим свойствам (табл. 3). Из данных табл. 4 видно, что все исследованные сорбенты достаточно эффективно удерживают белки (от 65% до

85%). Оказалось, что для трех полиамидсодержащих сорбентов (РА1, РА8 и РА11) сорбционная емкость мало зависит как от молекулярной массы, так и от рI белка и составляет 6,8-8,2 мг белка/г сорбента, и только для материала, модифицированного сополимером РА7, обнаруживается явная зависимость сорбционной емкости от природы белка (от значения его рI), но не от молекулярной массы (6,4-8,7 мг/г). В еще большей степени эта зависимость проявляется у материалов, модифицированных ПАНИ (5,9-9,2 мг/г). Таким образом, в случае материала РА7 и у ПАНИ-содержащих материалов, взятых для сравнения, сорбционная емкость растет с увеличением основности (рI) белка. Для остальных исследованных материалов эта зависимость сохраняется, но выражена не столь явно. Указанное свойство может быть использовано не только для очистки препаратов НК от белков, но также и для дальнейшего разделения белковой фракции.

Различие в средстве исследуемых покрытий к НК и белкам легко продемонстрировать на примере очистки ДНК от БСА при пропускании их смеси через картриджи с сорбентами. Сравнение величин отношений поглощения при 260 и 280 нм ( $A_{260}/A_{280}$ ) для растворов ДНК и белка, для их исходной смеси и для полученных элюатов свидетельствует, что материалы РА1 и особенно РА7 (содержащие трифторметильные группы) сравнимы по способности очищать препараты ДНК от белков с перфторполимер- и ПАНИ-содержащими материалами (табл. 4). Образцам ДНК, в наибольшей степени очищенным от белка, соответствуют отношения, равные 1,5 (РА1- и ПТФЭ-сорбенты), 1,7 (РА7-сорбент) и 1,9 (ФП-ПАНИ-сорбент). Аналогичные результаты получены для элюатов, собранных при выделении ДНК из бактериальных лизатов *E. coli* (1,5, 1,6 и 1,8, соответственно). Видно, что среди полиамидсодержащих материалов сорбенты РА1 и РА7 обеспечивают выделение наиболее чистых образцов ДНК из модельных и реальных биологических смесей. Это означает, что наиболее близкие сорбционные свойства по отношению к биополимерам проявляют полиамиды с электроноакцепторными группами и ПАНИ-содержащие материалы. Таким образом, показано, что введение в структуру полимерного модификатора дополнительных функциональных групп, незначительно, на первый взгляд, изменяющих суммарный химический состав (как в случае материалов РА7 и РА11), оказывает заметное влияние на сорбционные свойства получаемых полимерных покрытий.

### 3.2.2. Удерживание биополимеров в режиме динамической сорбции.

Сделанные выводы в целом подтверждаются результатами исследования динамической сорбции биополимеров, проведенного в режиме реального времени методом СКИ [21, 22] с использованием биосенсора на основе проточной микроячейки и детектора, состоящего из двух интерферометров, одним из которых служит тонкая стеклянная пластина с предварительно нанесенным покрытием исследуемого полимера. Над поверхностью покрытия пропускали исследуемый раствор биополимера и измеряли интерференцию между опорным лучом, отраженным от нижней поверхности пластины, и лучом, отраженным от поверхности раздела «адсорбционный слой – вода».

Фосфатные группы в молекуле ДНК полностью ионизированы при рН = 4,0. Таким образом, молекула ДНК заряжена отрицательно в широком диапазоне рН. В условиях проведения эксперимента (в среде с рН 7,2) заряд молекулы БСА наиболее близок к нейтральному по сравнению с другими исследованными белками, суммарный заряд лизоцима положительный, пепсина – отрицательный.

Из данных табл. 4 видно, что при пропускании раствора ДНК над исследуемой полимерной поверхностью во всех случаях адсорбционный слой не образуется. При использовании полиамидных модификаторов при подаче в кювету растворов белков с рI > 4 в зависимости от рН среды обратимо формируется адсорбционный слой толщиной 0,2-2,5 нм. В отличие от других покрытий, при использовании ПАНИ-покрытия белки прочно удерживаются при нейтральных значениях рН среды, и десорбируются только при существенном понижении рН. Таким образом, ПАНИ-покрытие проявляет максимальную динамическую сорбционную активность по сравнению с полиамидсодержащими покрытиями (время насыщения адсорбционного слоя превышает в 2,5-8,75 раз этот показатель по сравнению с полиамидными модификаторами, причем толщина формируемого слоя белковых молекул в случае ПАНИ-покрытия в большинстве случаев также превышает рассматриваемую величину, незначительно уступая только РА11-покрытию).

Поскольку ПАНИ является рН-чувствительным материалом, способность ПАНИ-содержащих сорбентов удерживать белки (сорбционная емкость) зависит от рН среды. Можно ожидать, что в нейтральных средах белки с более высокими значениями рI будут сильнее удерживаться на поверх-



ности ПАНИ-покрытия, что и подтверждается экспериментально. Макромолекулы пепсина (рI 2,2, отрицательно заряженные в среде с рН 7,2), так же, как и молекулы днДНК, в данных условиях не образуют адсорбционного слоя ни в одном случае. В случае БСА и лизоцима наблюдали иную картину. В обоих случаях на ПАНИ-поверхности формировался устойчивый адсорбционный слой, который сохранялся после прекращения подачи новых порций раствора белка и разрушался только в результате заметного понижения рН среды. После приведения раствора БСА в контакт с поверхностями других исследованных полимерных покрытий также происходила адсорбция белка, причем количество адсорбированного белка зависело от природы полимера (максимально в случае РА11 и минимально в случае РА1).

БСА является наиболее гидрофобным из всех исследованных белков [25] (табл. 3). Соответственно, покрытия более гидрофобных полимеров, содержащих фторметильную группу (РА1 и РА7), эффективно удерживают только БСА (толщина адсорбционного слоя 1,0-1,5 нм) и слабо удерживают менее гидрофобный и при этом положительно заряженный лизоцим (~0,2 нм). Таким образом, полиарамиды с электрондонорными группами (РА1 и РА7) нецелесообразно использовать для сорбции основных белков. Полимер РА8 хорошо удерживает как слабо отрицательно заряженный БСА, так и положительно заряженный в данных условиях лизоцим. Различие с ПАНИ-поверхностью в этом случае заключается в том, что на ПАНИ-покрытии, в отличие от РА8-покрытия, насыщенный адсорбционный слой образуется в 2,5 раза быстрее при сорбции БСА и в 5 раз быстрее при сорбции лизоцима (по-видимому, из-за стерических затруднений при сорбции 4-х субъединичного БСА).

Несмотря на различия в толщине образующихся слоев, во всех рассмотренных случаях, по-видимому, все же формируется мономолекулярный белковый слой, что следует из сравнения эффективных гидродинамических радиусов исследованных белков (~ 7 нм для БСА и ~ 2,2 нм для лизоцима) с учетом их молекулярных масс, числа аминокислотных остатков в составе полипептидной цепи и наличия четвертичной структуры у БСА. Наблюдаемые различия в толщине адсорбционного слоя являются, по-видимому, результатом происходящего в различной степени разворачивания макромолекул сорбата при сорбции на поверхности подложки, сопровождаемой изменением их конформации из-за разрушения гидратной оболочки и деградации четвертичной структуры (в случае БСА).

Видно, что сорбция БСА протекает быстро, достигая максимального значения через 1,5-4 мин. На ПАНИ-поверхности насыщенный адсорбционный слой ( $h = 1,65$  нм) образуется уже через 1,5 мин, на РА7-поверхности ( $h = 1,5$ ) – за 4 мин. На поверхностях, модифицированных полимерами РА8 и РА11, молекулы БСА формируют насыщенные адсорбционные слои ( $h = 1,4$  и 2,1 нм, соответственно) примерно за 2 мин. Однако при дальнейшем промывании тем же буферным раствором пластин, модифицированных полиарамидами, практически весь белок десорбируется, в результате чего наблюдается резкое уменьшение сигнала. Как и ожидалось, слабо заряженные в данных условиях макромолекулы БСА удерживаются на полиарамидной поверхности, по-видимому, за счет относительно слабых многоточечных контактов. При высокой концентрации белка в подвижной фазе и при относительно низкой скорости потока белковые молекулы формируют на поверхности полимерного покрытия адсорбционный слой, который затем разрушается и смывается с поверхности при прекращении подачи новых порций белка. Как оказалось, наблюдаемые эффекты обратимы. После промывки поверхности пластины чистой подвижной фазой при повторной подаче белков (кроме пепсина), растворенных в подвижной фазе с нейтральным значением рН, во всех случаях снова формируется адсорбционный слой белковых молекул.

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

Таким образом, методом СКИ удалось экспериментально подтвердить наличие наиболее важного с практической точки зрения эффекта, заключающегося в том, что при подаче в кювету раствора днДНК адсорбционный слой не образуется во всех исследованных случаях. Следовательно, как ПАНИ, так и полиарамиды проявляют сходную селективность при сорбции ДНК и белков. Но в отличие от полиарамидных покрытий, ПАНИ-покрытие удерживает белки и при отсутствии подачи дополнительных порций молекул сорбата в кювету,

а разрушение адсорбционного слоя происходит только после существенного понижения рН среды.

### 3.2.3. Вероятные механизмы сорбции НК и белков на исследованных сорбентах.

Мы рассмотрели приведенные в табл. 4 значения выхода НК и удерживания различных белков на поверхности исследованных модельных сорбентов. Видно, что степень очистки ДНК как от белка, так и от РНК изменяется в зависимости от структуры использованного полимерного модификатора. Можно предположить, что сорбционные свойства исследованных сорбентов определяются суммарным вкладом различных механизмов сорбции, происходящей в результате образования нековалентных взаимодействий (гидрофобных, ионных и водородных связей). Тот факт, что все материалы практически не удерживают отрицательно заряженную гидрофильную днДНК и одновременно более эффективно сорбируют РНК, содержащую гидрофобные участки, указывает на наличие гидрофобных взаимодействий между поверхностью сорбента и молекулами сорбата. Присутствие в структуре ПАНИ и полиарамидов заряженных и/или поляризованных групп и слабый положительный заряд поверхности соответствующих полимерных покрытий указывают на то, что соответствующие материалы могут обладать анионообменными свойствами. Вместе с тем, эти сорбенты (как и фторполимерсодержащие материалы) крайне слабо удерживают молекулы днДНК. Повидимому, ионообменные свойства этих сорбентов выражены слабо не только за счет стерических затруднений, но также за счет делокализации положительных зарядов по макромолекуле или даже между несколькими макромолекулами в составе покрытия (как известно, это справедливо для ПАНИ-содержащих материалов [26]), что препятствует образованию устойчивой ионной связи, требующей локализации и достаточного сближения противоположных зарядов на соответствующих атомах сорбента и сорбата. Поэтому молекулы днДНК, дополнительно стабилизированные многочисленными водородными связями внутри двунилевой структуры, на таких поверхностях не удерживаются, а макромолекулы белков, имеющие локализованные заряды на экспонированных в водной среде боковых группах, удерживаются в различной степени в зависимости от значения их рI.

Сходство сорбционных свойств полиарамидных и ПАНИ-покрытий в отношении белков проявляется также в том, что в динамических условиях БСА и лизоцим сорбируются, а кислый белок

пепсин (как и днДНК) не удерживается на поверхности исследованных полимеров.

В случае фторполимерсодержащих сорбентов вероятный вклад в сорбционные свойства обусловлен преимущественно гидрофобными взаимодействиями. Белковая фракция сорбируется из водной среды на неполярной поверхности фторполимера, характеризующейся низкой поверхностной энергией, в то время как отрицательно заряженные в широком диапазоне рН молекулы днДНК не удерживаются. РНК слабо удерживается и затем может быть элюирована в изократическом режиме. Удерживаемые компоненты белковой фракции затем также можно последовательно выделить в условиях градиента органического растворителя, аналогично тому, как это происходит при обращенно-фазовом разделении на С18-фазах. Полиарамидные материалы, содержащие наряду с гидрофобными участками электроноакцепторные группы (РА1 и особенно РА7) по выходу ДНК и по удерживанию белков оказались ближе всего к материалу ФП-ПАНИ.

Существенный вклад в механизм обратной сорбции белков на поверхности ПАНИ, по-видимому, вносит его способность к образованию водородных связей. Удерживание белков происходит в результате образования связей между атомами водорода вторичной аминогруппы в ПАНИ и акцепторами водородной связи в молекулах белка (таких как пептидные связи и более стерически доступные боковые карбоксилсодержащие группы, такие как Glu, Gln и т. д.). При понижении значения рН подвижной фазы изменяются как заряд белковой молекулы, так и способность поверхности сорбента образовывать водородные связи с молекулами сорбата. В результате протонирования атомов азота в макромолекуле ПАНИ белок десорбируется за счет разрушения водородных связей. Большую толщину адсорбционного слоя относительно слабо заряженных молекул БСА в случае РА11-покрытия по сравнению с РА8-покрытием можно объяснить наличием в структуре РА11 электроакцепторной сульфонильной группы, которая, оттягивая на себя электронную плотность ароматического кольца, придает поверхности псевдо-ионообменные свойства (эффективный отрицательный заряд в сульфонильной группе сосредоточен на атомах кислорода, эффективный положительный – на атоме серы). Это предположение подтверждается более прочным удерживанием положительно заряженного в условиях проведения эксперимента лизоцима на поверхности полимера РА11 (тол-

щина слоя ~2,5 нм). Примерно одинаковая толщина адсорбционных слоев БСА и лизоцима в случае РА7- и РА8-покрытий (~1,5 нм) при заметном различии в скорости формирования насыщенных адсорбционных слоев ( $dh_{\max}/dt$ , нм/мин) на указанных покрытиях (слой БСА образуется в 5 раз быстрее, чем слой молекул лизоцима на РА7-покрытии и в ~2 раза быстрее на РА8-покрытии) объясняется, по-видимому, наличием в структуре полимера РА7 фторметильных групп, благодаря чему сильнее проявляется дополнительное гидрофобное взаимодействие с гидрофобными сайтами молекул белка (в результате время, требуемое для формирования адсорбционного слоя, сокращается).

### 3.2.4. Сравнение данных по статической и динамической сорбции.

Отдельно следует рассмотреть некоторые различия, наблюдаемые при изучении сорбции биополимеров в статическом и динамическом режимах. Так, из данных (табл. 4) следует, что при пропускании модельных белковых растворов через картриджи с сорбентами кислый белок пепсин эффективно удерживается, в то время как при исследовании методом СКИ в режиме реального времени адсорбционный слой пепсина на всех исследованных полимерных поверхностях не образуется. Наиболее вероятное объяснение этого различия, по-видимому, заключается в проявлении эксклюзионного эффекта, реализуемого, например, при проведении гель-проникающей хроматографии. Пепсин удерживается слоем сорбента не в силу сорбционных свойств полимерного модификатора, а за счет сохранения пористости носителя, поскольку полимерное покрытие (толщина которого составляет 3-8 нм), образуется не только на внешней поверхности частиц кремнезема, но и на внутренней поверхности пор, причем полимерные пробки в просвете пор отсутствуют (табл. 4). Таким образом, несмотря на то, что полимерные покрытия при нейтральных значениях рН не удерживают пепсин, это не отражается на свойстве композиционных сорбентов удерживать суммарную белковую фракцию, т. е. эффективность применения таких сорбентов для выделения ДНК и очистки ее от белков существенно не снижается, т.к. более высокомолекулярные молекулы ДНК не успевают проникнуть во внутренние поры частиц сорбента и выходят в составе исключенного объема.

Аналогичный эффект, по-видимому, лежит в основе удерживания до 15% днДНК пористыми сорбентами при пропускании как модельных растворов ДНК, так и бактериальных лизатов через картриджи с сорбентами. В случае сорбентов с

наиболее тонкими полимерными покрытиями (см. табл. 2 и 4) это проявляется в уменьшении степени очистки ДНК от БСА (когда величины отношения  $A_{260}/A_{280}$  оказываются ниже 1,5).

Как и следовало ожидать, результаты хроматографического анализа хорошо коррелируют с данными, полученными в режиме реального времени с помощью метода СКИ, адаптированного к задачам настоящего исследования. Поэтому при сравнительной оценке сорбционных свойств полимерных покрытий в процессе разработки новых методов пробоподготовки с использованием сорбентов комплексное использование картриджного метода в сочетании с методом СКИ позволяет существенно понизить трудоемкость, стоимость и время, требуемое на проведение исследования (в первую очередь, по сравнению с методом ВЭЖХ).

### ВЫВОДЫ

Из полученных результатов следует, что низкая сорбционная активность по отношению к ДНК и высокая по отношению к РНК, нейтральным и основным белкам присуща достаточно широкому кругу полимеров, структура которых характеризуется наличием таких элементов, как ароматический азот, фторсодержащие группы, а также донорные и акцепторные фрагменты. Таким образом, в отличие от полимерных материалов, удерживающих в определенных условиях НК (таких как, например, полиэтиленмин [27, 28] или кремнеземы в присутствии хаотропных агентов [14]) и не связывающих белки (например, полипропилен [29] или полиакриламид [30]), можно также синтезировать материалы, которые ведут себя противоположным образом (рис. 4). К таким материалам, в частности, относятся сорбенты, модифицированные фторполимерами, ПАНИ и некоторыми полиамидами. Несмотря на присутствие в составе указанных полимеров сильно различающихся по химической структуре и свойствам функциональных групп и фрагментов, покрытия такими полимерами композиты проявляют сходное сорбционное поведение. Подбирая полимерный модификатор с соответствующей химической структурой, можно решать конкретные задачи по селективному выделению целевых биополимеров из сложных смесей, используя «нулевую» сорбционную способность к удерживанию ДНК и способность к обратимой сорбции белков, в зависимости от значения их рI. Количественные параметры сорбции при этом зависят как от химической структуры полимерного слоя в составе сорбента, так и от природы молекул сорбата, и в значительно меньшей степени – от морфологии поверхности сорбента.

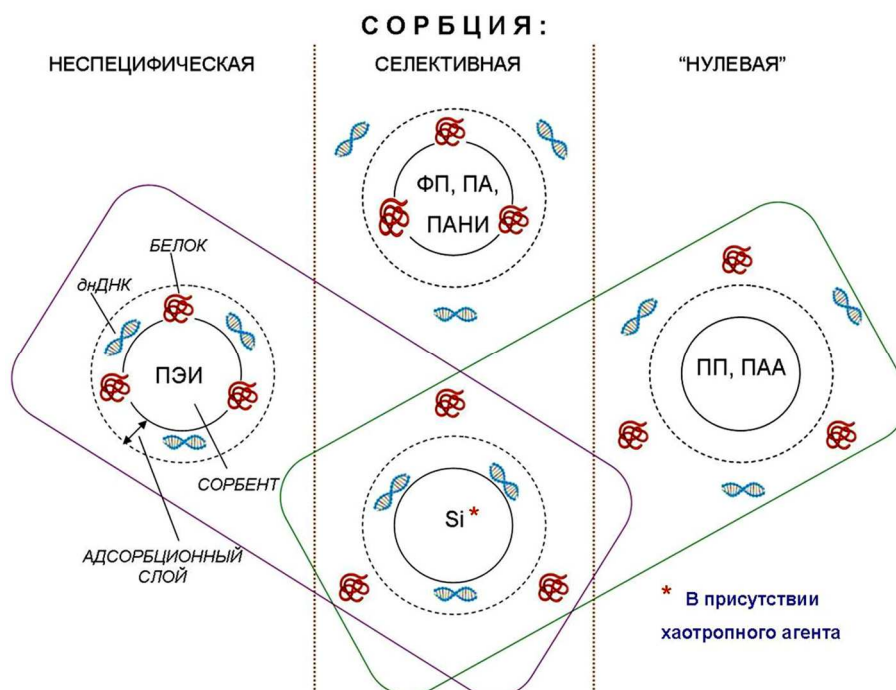


Рис. 4. Примеры возможных типов сорбции биополимеров (НК и белков) на различных материалах. Обозначения: Si – кремнезем, ФП – фторполимеры, ПА – полиарамиды, ПАНИ – полианилин, ПЭИ – полиэтиленгликоль, ПП – полипропилен, ПАА – полиакриламид

Fig. 4. Examples of possible types of sorption of biopolymers (NAs and proteins) on various materials. Designations: Si - silica, FP - fluoropolymers, PA - polyaramides, PANI - polyaniline, PEI - polyethylene imine, PP - polypropylene, PAA - polyacrylamide

В статье обсуждались свойства довольно широкого круга материалов, однако наиболее полезными с практической точки зрения представляются ПАНИ-содержащие сорбенты, которые обеспечивают более эффективную очистку ДНК от белков и характеризуются более высоким сродством к белкам, в отличие от сорбентов, модифицированных полиарамидами. ПАНИ-поверхность одинаково быстро и эффективно удерживает белки с различными значениями  $pI$ . Кроме того, использование ПАНИ-покрытий обеспечивает принципиальную дополнительную возможность последовательно выделять компоненты сорбированной белковой фракции, изменяя pH элюента в процессе пробоподготовки после этапа выделения ДНК. Таким образом, ПАНИ-содержащие сорбенты сле-

дует рассматривать в качестве наиболее перспективных материалов для пробоподготовки в молекулярной диагностике.

В целом, использование соединений (таких как полиарамиды), моделирующих химическое строение фторполимер- и ПАНИ-модификаторов, практически оправдано при комплексном исследовании сорбционных свойств с использованием различных физико-химических методов, как для оценки результатов статической сорбции, так и для регистрации результатов динамической сорбции в режиме реального времени.

*Работа частично была поддержана грантом РФФИ №15-59-32401 РТ-оми Новые мультифункциональные наноструктурированные полимерные материалы (RT-omi No. 15-59-32401 New Multifunctional Nanostructured Polymer Materials).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Glick B.R., Pasternak J.J.** Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. Washington, D.C.: ASM PRESS. 1998. 710 p.
2. **Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семёнов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д.** ПЦР в реальном времени. М.: БИНОМ Лаборатория знаний. 2014. 228 с.
3. **Chomczynski P., Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1986. P. 156–159. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90021-2.

#### REFERENCES

1. **Glick B.R., Pasternak J.J.** Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. Washington, D.C.: ASM PRESS. 1998. 710 p.
2. **Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu., Semyonov P.A., Savilova A.M., Kofiadi I.A., Abramov D.D.** Real-time PCR. M.: BINOM Laboratory of knowledge. 2014. 228 p. (in Russian).
3. **Chomczynski P., Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1986. P. 156–159. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90021-2.

4. Carr S.M., Griffiths O.M. Preparative density-gradient ultracentrifugation of DNA. *Biochem. Genet.* 1987. V. 25. P. 385–390. DOI: 10.1007/BF00554547.
5. Zeugin J.A., Hartley J.L. Ethanol Precipitation of DNA. *Focus.* 1985. V. 7. N 4. P. 1–2.
6. Lehmann U., Vandevyver C., Parashar V.K., Gijs M.A. Droplet-based DNA purification in a magnetic lab-on-a-chip. *Angew. Chem.* 2006. V. 45. N 19. P. 3062–3067. DOI: 10.1002/anie.200503624.
7. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990. V. 28. N 3. P. 495–503.
8. Zubov V.P., Plobner L., Kapustin D.V., Balayan H., Muydinov M., Brem G., Leiser R.M. Sorbent material having a covalently attached perfluorinated surface with functional groups. Patent US 2006243658, 2006.
9. Kapustin D.V., Zavada L.L., Barsamjan G.B., Ponomarev N.N., Zubov V.P., Leiser R.-M., Plobner L., Yarochevskaia E.M. New hydrophobic polymer comprising fluorine moieties. Patent US 20080015341A1, 2008.
10. Kapustin D.V., Yagudaeva E.Yu., Zubov V.P., Muydinov M.R., Yaroshevskaja E.M., Plobner L., Leiser R.-M., Brem G. New polymer-coated materials for one-step separation of nucleic acids. in: *Frontiers in DNA Research*. C.R. Woods (Ed.). New York: Nova Science Publishers. 2006. P. 113–136.
11. Kapustin D., Prostyakova A., Bryk Y., Yagudaeva E., Zubov V. New composite materials modified with nano-layers of functionalized polymers for bioanalysis and medical diagnostics. In: *Nanocomposites and polymers with analytical methods*. Croatia: Intech. 2011. P. 82–106. DOI: 10.5772/18081.
12. Kapustin D.V., Yagudaeva E.Yu., Zavada L.L., Zhigis L.S., Yaroshevskaya E.M., Plobner L., Leiser R.-M., Zubov V.P. A composite polyaniline-containing silica sorbent for DNA isolation. *J. Bioorg. Chem.* 2003. V. 29. N 3. P. 281–285. DOI: 10.1023/A:1023992701568.
13. Yagudaeva E.Yu., Bukina Ya.A., Prostyakova A.I., Zubov V.P., Tverskoy V.A., Kapustin D.V. Oxidative polymerization of aniline on the surface of silica in the presence of poly(sulfonic acids) as a method of preparing efficient biosorbents. *Polym. Sci. Ser. A.* 2009. V. 51. N 6. P. 675–682. DOI: 10.1134/S0965545X09060121.
14. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Ryazantsev D.Yu., Zubov V.P. Novel composite matrices modified with nanolayers of polymers as perspective materials for bioseparation and bioanalysis. *Nanomedicine.* 2011. V. 6. N 2. P. 241–255 DOI: 10.2217/nmm.11.6.
15. Zubov V.P., Kapustin D.V., Generalova A.N., Yagudaeva E.Yu., Vikhrov A.A., Sizova S.V., Muidinov M.R. Modification of solids with polymer nanolayers as a process for manufacture of novel biomaterials. *Polym. Sci. Ser. A.* 2007. V. 49. N 12. P. 2042–2062. DOI: 10.1134/S0965545X07120036.
16. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Zubov V.P. Fluoroplast-polyaniline-coated adsorbent for one-step isolation of DNA for PCR detection of viral hepatitis (HBV and TTV). *Bioanalysis.* 2014. V. 6. P. 957–966. DOI: 10.4155/bio.13.332.
17. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Alexeev Ya.I., Varlamov D.A., Zubov V.P., Zavriv S.K. High-throughput method of one-step DNA isolation for PCR diagnostics of Mycobacterium tuberculosis. *Acta Naturae.* 2014. V. 6. N 2. P. 48–52.
18. Ivanov A.E., Saburov V.V., Zubov V.P. Polymer-Coated Adsorbents for the Separation of Biopolymers and Particles.
4. Carr S.M., Griffiths O.M. Preparative density-gradient ultracentrifugation of DNA. *Biochem. Genet.* 1987. V. 25. P. 385–390. DOI: 10.1007/BF00554547.
5. Zeugin J.A., Hartley J.L. Ethanol Precipitation of DNA. *Focus.* 1985. V. 7. N 4. P. 1–2.
6. Lehmann U., Vandevyver C., Parashar V.K., Gijs M.A. Droplet-based DNA purification in a magnetic lab-on-a-chip. *Angew. Chem.* 2006. V. 45. N 19. P. 3062–3067. DOI: 10.1002/anie.200503624.
7. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990. V. 28. N 3. P. 495–503.
8. Zubov V.P., Plobner L., Kapustin D.V., Balayan H., Muydinov M., Brem G., Leiser R.M. Sorbent material having a covalently attached perfluorinated surface with functional groups. Patent US 2006243658, 2006.
9. Kapustin D.V., Zavada L.L., Barsamjan G.B., Ponomarev N.N., Zubov V.P., Leiser R.-M., Plobner L., Yarochevskaia E.M. New hydrophobic polymer comprising fluorine moieties. Patent US 20080015341A1, 2008.
10. Kapustin D.V., Yagudaeva E.Yu., Zubov V.P., Muydinov M.R., Yaroshevskaja E.M., Plobner L., Leiser R.-M., Brem G. New polymer-coated materials for one-step separation of nucleic acids. in: *Frontiers in DNA Research*. C.R. Woods (Ed.). New York: Nova Science Publishers. 2006. P. 113–136.
11. Kapustin D., Prostyakova A., Bryk Y., Yagudaeva E., Zubov V. New composite materials modified with nano-layers of functionalized polymers for bioanalysis and medical diagnostics. In: *Nanocomposites and polymers with analytical methods*. Croatia: Intech. 2011. P. 82–106. DOI: 10.5772/18081.
12. Kapustin D.V., Yagudaeva E.Yu., Zavada L.L., Zhigis L.S., Yaroshevskaya E.M., Plobner L., Leiser R.-M., Zubov V.P. A composite polyaniline-containing silica sorbent for DNA isolation. *J. Bioorg. Chem.* 2003. V. 29. N 3. P. 281–285. DOI: 10.1023/A:1023992701568.
13. Yagudaeva E.Yu., Bukina Ya.A., Prostyakova A.I., Zubov V.P., Tverskoy V.A., Kapustin D.V. Oxidative polymerization of aniline on the surface of silica in the presence of poly(sulfonic acids) as a method of preparing efficient biosorbents. *Polym. Sci. Ser. A.* 2009. V. 51. N 6. P. 675–682. DOI: 10.1134/S0965545X09060121.
14. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Ryazantsev D.Yu., Zubov V.P. Novel composite matrices modified with nanolayers of polymers as perspective materials for bioseparation and bioanalysis. *Nanomedicine.* 2011. V. 6. N 2. P. 241–255 DOI: 10.2217/nmm.11.6.
15. Zubov V.P., Kapustin D.V., Generalova A.N., Yagudaeva E.Yu., Vikhrov A.A., Sizova S.V., Muidinov M.R. Modification of solids with polymer nanolayers as a process for manufacture of novel biomaterials. *Polym. Sci. Ser. A.* 2007. V. 49. N 12. P. 2042–2062. DOI: 10.1134/S0965545X07120036.
16. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Zubov V.P. Fluoroplast-polyaniline-coated adsorbent for one-step isolation of DNA for PCR detection of viral hepatitis (HBV and TTV). *Bioanalysis.* 2014. V. 6. P. 957–966. DOI: 10.4155/bio.13.332.
17. Kapustin D.V., Prostyakova A.I., Alexeev Ya.I., Varlamov D.A., Zubov V.P., Zavriv S.K. High-throughput method of one-step DNA isolation for PCR diagnostics of Mycobacterium tuberculosis. *Acta Naturae.* 2014. V. 6. N 2. P. 48–52.
18. Ivanov A.E., Saburov V.V., Zubov V.P. Polymer-Coated Adsorbents for the Separation of Biopolymers and Particles.



- Adv. Polym. Sci.* 1992. V. 104. P. 136-175. DOI: 10.1007/3-540-55109-3\_4.
19. Капустин Д.В., Zubov В.П. Синтез универсальных биосовместимых фторполимер- и полианилинсодержащих нанокомпозитов и их применение в биосепарации и биоанализе. *Вестн. МИТХТ*. 2011. Т. 6. № 5. С. 21-46.
  20. Vaczine-Shlosser G., Ribbing C., Bachman P.K., Zubov V.P., Kapustin D.V. Surface coating for laser desorption ionization mass spectrometry of molecules. Patent WO 2011004308 (A1), 2011.
  21. Nikitin P.I., Gorshkov B.G., Nikitin E.P., Ksenevich T.I. Picoscope, a new label-free biosensor. *Sensors Actuators B*. 2005. V. 111-112. P. 500-504. DOI: 10.1016/j.snb.2005.03.043.
  22. Дирюгина Е.Г., Буренин А.Г., Никитин М.П., Орлов А.В., Никитин П.И. Детекция в реальном времени аутоантител в сыворотке крови с помощью безметочной биосенсорной системы Пикоскоп®. *Труды МФТИ*. 2012. Т. 4. Вып. 3. С. 11-17.
  23. Liaw D.-J., Yagudaeva E.Yu., Prostyakova A.I., Lazov M.A., Zybin D.I., Ischenko A.A., Zubov V.P., Chang C.-H., Huang Y.-C., Kapustin D.V. Sorption behavior of polyaramides in relation to isolation of nucleic acids and proteins. *Colloids Surf. B*. 2016. V. 145. P. 912-921. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.068
  24. Yagudaeva E. Yu., Liaw D.-J., Ischenko A.A., Bagratashvili V. N., Zubov V.P., Prostyakova A.I., Ryazantsev D.Yu., Sviridov A.P., Kapustin D.V. New polyamide-containing sorbents for one-step isolation of DNA. *J. Mater. Sci.* 2014. V. 49. N 9. P. 3491-3496. DOI: 10.1007/s10853-014-8062-1.
  25. Демин А.А., Чернова И.А., Шатаева Л.К. Ионообменная сорбция биологически-активных веществ. СПб.: Издательство СПбГУ. 2008. 69 с.
  26. Focke W.W., Wnek G.E., Wei Y. Influence of oxidation state, pH, and counterion on the conductivity of polyaniline. *J. Phys. Chem.* 1987. V. 91. N 22. P. 5813-5818. DOI: 10.1021/j100306a059.
  27. Burgess R.R. Use of polyethyleneimine in purification of DNA-binding proteins. *Methods Enzymol.* 1991. V. 208. P. 3-10. DOI: 10.1016/0076-6879(91)08003-Z.
  28. Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.P. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1995. V. 92. P. 7297-7301. DOI: 10.1073/pnas.92.16.7297.
  29. Hernández-Aguirre O.A., Núñez-Pineda A., Tapia-Tapia M., Espinosa R.M.G. Surface Modification of Polypropylene Membrane Using Biopolymers with Potential Applications for Metal Ion Removal. *J. Chem.* 2016. P. 1-11. DOI: 10.1155/2016/2742013.
  30. Liu D. Handbook of Nucleic Acid Purification. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press Taylor & Francis Group. 2009. 584 p. DOI: 10.1201/9781420070972.
- Adv. Polym. Sci.* 1992. V. 104. P. 136-175. DOI: 10.1007/3-540-55109-3\_4.
19. Kapustin D.V., Zubov V.P. Synthesis of all-purpose biocompatible fluoropolymer- and polyaniline-containing nanocomposites and their application in bioseparation and bioassay. *Fine Chemical Technologies (Vestn. MITHT)*. 2011. V. 6. N 5. P. 21-46 (in Russian).
  20. Vaczine-Shlosser G., Ribbing C., Bachman P.K., Zubov V.P., Kapustin D.V. Surface coating for laser desorption ionization mass spectrometry of molecules. Patent WO 2011004308 (A1), 2011.
  21. Nikitin P.I., Gorshkov B.G., Nikitin E.P., Ksenevich T.I. Picoscope, a new label-free biosensor. *Sensors Actuators B*. 2005. V. 111-112. P. 500-504. DOI: 10.1016/j.snb.2005.03.043.
  22. Diryugina E.G., Burenin A.G., Nikitin M.P., Orlov A.V., Nikitin P.I. Real-time detection of autoantibody in serum using a biosensorless biosensor system Picoskop®. *Trudy MFTI* 2012. V. 4. N 3. P. 11-17 (in Russian).
  23. Liaw D.-J., Yagudaeva E. Yu., Prostyakova A.I., Lazov M.A., Zybin D.I., Ischenko A.A., Zubov V.P., Chang C.-H., Huang Y.-C., Kapustin D.V. Sorption behavior of polyaramides in relation to isolation of nucleic acids and proteins. *Colloids Surf. B*. 2016. V. 145. P. 912-921. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2016.05.068
  24. Yagudaeva E. Yu., Liaw D.-J., Ischenko A.A., Bagratashvili V. N., Zubov V.P., Prostyakova A.I., Ryazantsev D.Yu., Sviridov A.P., Kapustin D.V. New polyamide-containing sorbents for one-step isolation of DNA. *J. Mater. Sci.* 2014. V. 49. N 9. P. 3491-3496. DOI: 10.1007/s10853-014-8062-1.
  25. Demin A.A., Chernova I.A., Shataeva L.K. Ion-exchange sorption of biologically active substances. SPb.: Publishing house of the St. Petersburg University. 2008. 69 p. (in Russian).
  26. Focke W.W., Wnek G.E., Wei Y. Influence of oxidation state, pH, and counterion on the conductivity of polyaniline. *J. Phys. Chem.* 1987. V. 91. N 22. P. 5813-5818. DOI: 10.1021/j100306a059.
  27. Burgess R.R. Use of polyethyleneimine in purification of DNA-binding proteins. *Methods Enzymol.* 1991. V. 208. P. 3-10. DOI: 10.1016/0076-6879(91)08003-Z.
  28. Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.P. A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in vivo: Polyethylenimine. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1995. V. 92. P. 7297-7301. DOI: 10.1073/pnas.92.16.7297.
  29. Hernández-Aguirre O.A., Núñez-Pineda A., Tapia-Tapia M., Espinosa R.M.G. Surface Modification of Polypropylene Membrane Using Biopolymers with Potential Applications for Metal Ion Removal. *J. Chem.* 2016. P. 1-11. DOI: 10.1155/2016/2742013.
  30. Liu D. Handbook of Nucleic Acid Purification. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press Taylor & Francis Group. 2009. 584 p. DOI: 10.1201/9781420070972.

Поступила в редакцию 07.09.2017  
Принята к опубликованию 09.10.2017

Received 07.09.2017  
Accepted 09.10.2017