

СИНТЕЗ МНОГОЦЕЛЕВЫХ ФТОРПОЛИМЕР- И ПОЛИАНИЛИН-СОДЕРЖАЩИХ НАНОКОМПОЗИТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В БИОСЕПАРАЦИИ, БИОАНАЛИЗЕ И ДИАГНОСТИКЕ

*Д.В. Капустин, старший научный сотрудник, В.П. Зубов, профессор
кафедры Химии и технологии высокомолекулярных соединений им. С.С. Медведева

МИТХТ им. М.В. Ломоносова

*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

e-mail: kapustin@ibch.ru

Рассмотрены традиционные и усовершенствованные способы получения композиционных носителей, модифицированных нанослоями фторполимеров и полианилинов, обеспечивающие локализацию процесса полимеризации в поверхностных слоях носителя и придание получаемым наносистемам дополнительной функциональности. Продемонстрирована эффективность применения полученных композитов в биосепарации и в биоаналитических целях.

Traditional and improved methods of producing composite supports modified with nanolayers of fluoropolymers and polyanilines are reviewed. The methods provide the localization of the polymerization process at the surface layers of the carrier and additional functionality of the produced nanosystems. The effectiveness of the obtained materials in different fields of bioseparation and bioanalysis has been demonstrated.

Ключевые слова: фторполимеры, полианилины, радиационная пост-полимеризация, окислительная полимеризация, матричная полимеризация, гетерогенные инициаторы, наноконпозиционные сорбенты, выделение ДНК, ПЦР-диагностика, масс-спектрометрия.

Key words: fluoropolymers, polyanilines, radiation post-polymerization, oxidative precipitate polymerization, matrix polymerization, heterogeneous initiators, nanocomposite adsorbents, DNA isolation, PCR-diagnostics, mass-spectrometry.

Введение

В лабораторной диагностике инфекционных заболеваний, наряду с традиционными микробиологическими и иммунологическими методами, уже широко применяются новые подходы, основанные на использовании молекулярно-генетических технологий. Применение этих методов во многом стало возможным благодаря разработке в середине 80-х годов прошлого века процесса искусственного многократного копирования молекулы ДНК и дальнейшему стремительному развитию этой технологии, в настоящее время известной как «полимеразная цепная реакция» (ПЦР). ПЦР сделала рутинным анализ специфических полинуклеотидных последовательностей многих патогенных микроорганизмов. Универсальность, высокая чувствительность и относительная простота исполнения сделали метод ПЦР незаменимым для прямого обнаружения и идентификации возбудителей заболеваний [1], молекулярного типирования и исследования свойств патогенных микроорганизмов [2], анализа мутаций, связанных с генетическими заболеваниями у человека, идентификации личности [3]. Вместе с тем, наряду со многими преимуществами ПЦР-диагностики (возможность определения некультивируемых видов бактерий и вирусов), серьезную проблему представляет выбор конкретных методов подготовки клинических образцов к исследованию. В настоящее время не существует универсального подхода к выделению ДНК разных видов организмов и даже из организмов одного типа, но из различных источников. Быстрые методы подготовки проб, предусматривающие возможность автоматизации, не всегда обеспечивают требуемый уровень чистоты выделяемой нуклеиновой кислоты. С другой стороны, многоэтапные методики, позволяющие очистить и сконцентрировать ДНК (РНК) для ПЦР-анализа, ока-

зываются трудоемкими и могут увеличивать риск контаминации образцов.

Современные методы выделения и очистки биополимеров (в частности, нуклеиновых кислот) отличаются большим разнообразием. Широко применяются различные сорбционные материалы, органические, водные и смешанные среды, лизирующие агенты и т. д. Некоторые методы относительно просты, для реализации других требуется сложное оборудование. Тем не менее, в подавляющем большинстве случаев эти методы основываются на физико-химических процессах, включающих экстракцию (в том числе твердофазную) целевого компонента [4–10] или его осаждение (физическое осаждение или химическую сорбцию) [11–16]. В отдельную группу методов выделяют способы разделения биополимеров в смеси водных растворов полимеров (т. е. в двухфазной водной системе), например, в смеси 5% раствора декстрана и 3.5% полиэтиленгликоля [17]. Наконец, способы разделения смесей веществ или частиц, основанные на различиях в скоростях их перемещения в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз, объединены в многочисленную группу хроматографических методов, которые, в частности, широко применяются при разделении смесей белков и/или нуклеиновых кислот [18].

В основном, хроматографические способы разделения биополимеров (в частности, нуклеиновых кислот) основаны на различной растворимости нуклеиновых кислот, белков и полисахаридов. Однако, несмотря на их эффективность, большинство современных методов разделения многостадийны, трудоемки и требуют определенных затрат времени, так как основываются на концепции «улавливания» и удерживания целевого биополимера (нуклеиновой кислоты) сорбентом из смеси на первом этапе разделения с

последующей отмывкой от примесей и элюцией целевого компонента из хроматографического материала (сорбента, мембраны и т. п.) на последующих этапах. Разнообразие практических задач (разделение различных классов биологически активных веществ, включая биополимеры, выделение биополимеров определенного класса из сложных смесей, разделение и очистка индивидуальных соединений с аналогичной химической структурой и т. д.) определяет широкий выбор биосовместимых сорбционных материалов, однако такие материалы трудно назвать универсальными. В контексте настоящего обзора под «универсальным» сорбентом следует понимать материал, совместимый с различными классами биополимеров, содержащихся в исходном образце, иными словами, материал, обеспечивающий выделение различных типов биополимеров с сохранением их исходной структуры и свойств (следовательно, не вызывающий их необратимую денатурацию).

Известно несколько полимерных материалов, которые могут быть эффективными при выделении нуклеиновых кислот и белков с применением более простой концепции биосепарации (по сравнению с традиционными многостадийными протоколами), т. е. в случаях, когда нуклеиновые кислоты не удерживаются сорбентом, в то время как белки и другие компоненты смеси эффективно сорбируются [19]. Однако полимеры, демонстрирующие данный тип сепарационного поведения, такие как политетрафторэтилен (ПТФЭ) и полианилин (ПАНИ), сами по себе не обладают ни механическими, ни технологическими свойствами, позволяющими получать «хорошие» пористые сорбенты из этих материалов. На практике эта проблема решается путем создания композиционных сорбентов, т. е. твердых носителей, модифицированных нанослоями соответствующих полимеров.

Действительно, было показано, что композиционные сорбенты, модифицированные ПТФЭ и ПАНИ, оказались эффективными при одностадийной очистке нуклеиновых кислот от белков. Однако технологии, обычно используемые при получении ПТФЭ- и ПАНИ-модифицированных сорбентов, несмотря на сходство хроматографических свойств этих материалов, очень различны, сложны и трудно масштабируются. В случае ПТФЭ-содержащих материалов – это γ -иницированная пост-полимеризация тетрафторэтилена (ТФЭ) в адсорбционных слоях при низких температурах [20]. В случае ПАНИ-содержащих материалов – это окислительная осадительная полимеризация в водных средах с последующим распределением наночастиц ПАНИ на поверхности носителя. Кроме того, сорбенты, полученные с использованием указанных технологий, не всегда оказывались эффективными при получении очищенных препаратов нуклеиновых кислот из «трудных» образцов, например, из цельной крови, тканей растений и пр., содержащих наряду с белками мощные ингибиторы ПЦР, такие как гем и хлорофиллы, в ряде случаев возникали трудности при разделении ДНК и РНК или двунитевой

и одонитевой ДНК и т. д.

Таким образом, высокий уровень развития биомедицинского направления биотехнологии определяет актуальность разработки новых, более универсальных композиционных сорбентов и методов выделения и очистки биологически активных соединений, таких как нуклеиновые кислоты, белки и пептиды, из различных источников (бактериальные и клеточные лизаты, кровь, клинические образцы тканей человека). С технологической точки зрения очевидный интерес представляет также разработка технологии, позволяющей формировать на поверхности твердых матриц нанослои таких разных в химическом отношении модификаторов, как, например, ПТФЭ и ПАНИ. При этом, кроме сохранения функциональной активности выделенных соединений (в том числе при хранении), особое внимание следует обращать на такой важный фактор как время, затрачиваемое на очистку и выделение биополимеров; необходимо также оценивать возможность масштабирования и автоматизации процесса выделения.

В предлагаемом читателю обзоре рассмотрены новые композиционные биосовместимые (т. е. позволяющие сохранить функциональные свойства биополимеров в процессе выделения/очистки) сорбенты на основе макропористых и непористых твердых носителей, модифицированных нанослоями функционализированных полимеров (в частности, фторсодержащих полимеров и полианилинов). Данные сорбенты были разработаны для решения проблемы одностадийного выделения и очистки биополимеров (нуклеиновых кислот), однако, благодаря сочетанию оптимальной морфологии носителей и уникальных сорбционных свойств полимерных модификаторов, область их применения оказалась значительно шире. В частности, продемонстрирована эффективность применения полученных материалов при выделении ДНК различного происхождения (в том числе из клинических образцов), непосредственно пригодной для использования в ПЦР-анализе, для дальнейшего разделения компонентов выделяемой белковой фракции, для разделения смесей пептидов и белков в аналитических целях (например, при непосредственном проведении SELDI-TOF-MS-анализа) и разделения близких по составу соединений (одно- и двунитевых нуклеиновых кислот).

1. «Прямой синтез» композиционных сорбентов как способ получения наноматериалов с контролируемой морфологией

Материалы и системы с наноразмерными компонентами с успехом применяются в таких областях как электроника и информатика, аналитическая химия и диагностика, в качестве катализаторов и материалов биомедицинского назначения. Широкое применение полимерных и полимерсодержащих наноматериалов, в том числе сорбентов, определяется доступностью и воспроизводимостью эффективных технологий их получения. Однако на практике часто приходится сталкиваться с тем, что обыкновенно применяемая «технологическая цепочка» получения изделий из

полимеров, включающая на первом этапе синтез макромолекул, а на втором этапе переработку полимера в готовое изделие, как правило, не способна обеспечить получение наноструктурированных изделий. Одним из подходов к решению этой проблемы может быть проведение синтеза макромолекул и получение желаемого объекта в одну стадию, то есть «прямой синтез» наноструктурированного изделия. Можно привести немало примеров «прямого синтеза» при получении изделий из полимеров на макро- и микроуровнях. Сюда относятся, в частности, получение материалов и композитов из отверждающихся олигомеров, получение органического стекла полимеризацией в формах, получение полимерных дисперсий (латексов) эмульсионной или микросуспензионной полимеризацией и др. Однако переход к получению наноструктурированных объектов, очевидно, предполагает разработку новых методических и технологических подходов.

1.1. Получение полимерных нанопокровов на твердых матрицах

Постановка задачи, вынесенной в подзаголовок, определяется рядом условий. Помимо обоснованного выбора исходных материалов (включая реагенты, необходимые для осуществления макромолекулярной реакции) и условий, обеспечивающих формирование желаемой наноструктуры покрытия (с учетом требований конкретной применяемой технологии), при получении стабильных и функциональных полимерных нанопокровов также следует учитывать дополнительные требования. Во-первых, биосовместимые материалы, в частности, хроматографические сорбенты для биосепарации и биоанализа, носители для иммобилизации биомолекул и получения биокатализаторов, биосенсоры и др. должны обеспечивать эффективное взаимодействие с биологическими наноразмерными объектами (молекулами и частицами). С другой стороны, структурно-функциональные свойства таких материалов должны отвечать современной тенденции в развитии биоаналитических систем в направлении миниатюризации и автоматизации.

Подобные системы могут быть созданы, в частности, на базе пористых или плоских твердых матриц. Матрицы из полимерных материалов позволяют обеспечить высокую химическую стойкость, заданные адсорбционные свойства, наличие необходимых функциональных (якорных) групп, биосовместимость, но в то же время, как правило, не обладают достаточной жесткостью (и ненабухаемостью) и не дают возможности получения структурно однородных мезопористых систем ($d_{\text{пор}} \sim 10\text{--}100$ нм). Неорганические матрицы (например, на основе оксидов кремния, алюминия, циркония), напротив, представляют собой морфологически совершенные жесткие мезопористые или непористые каркасные структуры, но не обеспечивают желаемого химического разнообразия структуры поверхностного слоя, наличия необходимых функциональных групп, отличаются

высокой неспецифической сорбцией биологических молекул и частиц. При этом они химически нестабильны, особенно при экстремальных значениях pH среды. Широко применяемая модификация поверхности неорганических матриц кремнийорганическими соединениями (и другими низкомолекулярными модификаторами) лишь частично устраняет эти недостатки. Авторами настоящего обзора был предложен подход, позволяющий сочетать в одном материале преимущества неорганических и органических полимерных материалов [19, 20]. Суть его состоит в нанесении однородных полимерных нанослоев (толщиной 2–10 нм) различного химического строения на поверхность неорганических матриц с получением соответствующего нанокompозитного материала, поверхность которого, контактирующая с биологическими молекулами и частицами, будет вести себя как соответствующий полимер, а жесткость и морфология (пористость) определяется свойствами исходной неорганической матрицы. Прямой синтез таких нанокompозитов предполагает, что реакции синтеза макромолекул будут сопровождаться образованием однородных полимерных нанопокровов, прочно (химически) связанных с матрицей, в том числе на внутренней поверхности пор.

Схематически структура такого полимерномодифицированного пористого композита в сравнении с морфологически менее совершенным композитом того же брутто-состава приведена на рис. 1. Для модификации пористых матриц нанослоями полимеров использовали различные макромолекулярные реакции в поверхностных слоях твердых матриц и различные по химической структуре мономеры, олигомеры и активированные полимеры. Ряд примеров представлен на рис. 2. Выбор химического строения полимерного модификатора определялся с учетом его потенциальных характеристик как материала, непосредственно взаимодействующего с биологическими молекулами и частицами. Реакции, используемые для синтеза соответствующих композитов, включают гомо- и сополимеризацию с раскрытием двойной связи виниловых мономеров (тетрафторэтилена, трифторстирола и других мономеров), отверждение олигомеров (фторирование олигомеров бутадиена [20, 21]), окислительную (со)полимеризацию анилина (и/или замещенных анилинов), хемосорбцию реакционноспособных макромолекул (поли-*n*-нитрофенилакрилат [22], полисульфокислоты) на твердых поверхностях. В последнем случае после химического «прикрепления» макромолекул полимерного модификатора к твердой поверхности остаточные активированные группы, составляющие до 90% от исходных, могут быть использованы для введения в хемосорбированные макромолекулы различных заместителей [22]. Таким образом, из одной и той же «базовой» матрицы можно получать широкий набор материалов с различным гидрофильно-гидрофобным балансом, с различными ионогенными группами, а также содержащие связанные на полимерных спейсерах биомолекулы [23].

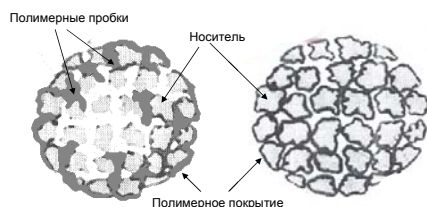


Рис. 1. Морфология композиционных полимер-содержащих сорбентов. Полимерное покрытие должно быть тонким и равномерно распределенным по поверхности носителя, обеспечивая снижение неспецифической сорбции и повышение химической стабильности композиционного сорбента. При этом значения внутреннего диаметра и объема пор носителя не должны значительно уменьшаться.

Следует еще раз заметить, что сорбционное поведение, полезное с биотехнологической точки зрения, присуще различным полимерным материалам, однако из-за особенностей синтеза и физико-химических свойств такие полимеры сами по себе трудно рассматривать в качестве «хороших» сорбентов. Практическое решение было найдено при использовании подходящих пористых и непористых твердых носителей, моди-

фицированных равномерно нанесенными полимерными нанопокрывтиями, получаемыми в результате протекания соответствующих макромолекулярных реакций в присутствии носителя. Это означает, что наряду с «обычными» химическими проблемами, возникающими при синтезе макромолекул, в процессе получения таких композитов необходимо обеспечивать следующие условия: (1) локализовать реакцию на поверхности носителя (избегая протекания реакции в объеме реакционной смеси); (2) контролировать толщину (на нанометровом уровне) и морфологию (обеспечивая получение бездефектного слоя) полимерного покрытия; наконец, (3) следует стремиться к разработке «универсальной» методики синтеза, позволяющей реализовывать воспроизводимые протоколы синтеза, пригодные для химически различных систем.

Рассмотрим некоторые из приведенных на рис. 2 примеров подробнее, останавливаясь, главным образом, на особенностях технологии получения и практического применения сорбентов, модифицированных «универсальными» полимерными модификаторами, такими как ПТФЭ и ПАНИ.

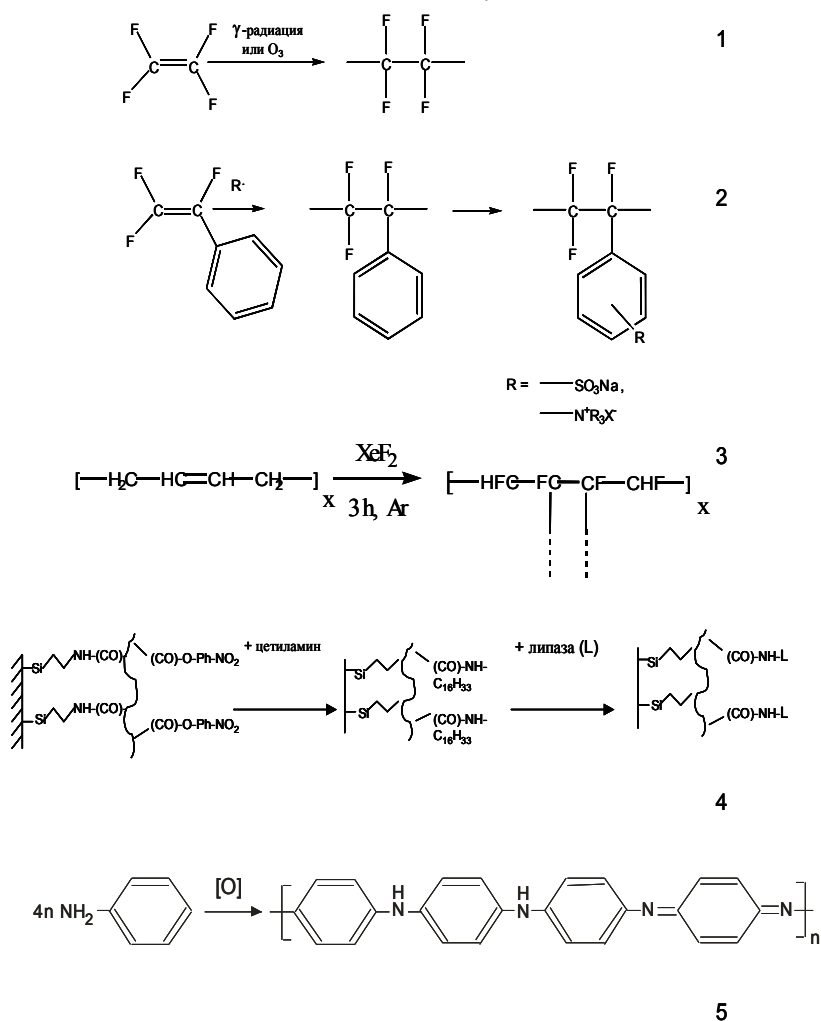


Рис. 2. Примеры химических реакций, используемых при создании полимерных наноструктур на твердых поверхностях: 1 — графт-полимеризация ТФЭ на остаточных радикалах, образующихся на поверхности неорганического носителя в результате воздействия γ -излучения или озона; 2 — радикальная полимеризация трифторстирола; 3 — отверждение олигобутадиена дифторидом ксенона; 4 — хемосорбция поли-*n*-нитрофенилакрилата с последующей иммобилизацией биолиганда (липазы); 5 — окислительная полимеризация анилина.

1.2. Неорганические пористые матрицы, модифицированные нанослоями политетрафторэтилена

ПТФЭ уникален благодаря своей исключительной химической и биологической инертности и специфическим сорбционным свойствам (см. ниже). Однако, с хроматографической точки зрения, этот материал нельзя назвать идеальным, в силу его нерастворимости в известных растворителях, неплавкости и мягкости. Таким образом, изготовление на основе ПТФЭ жестких мезопористых матриц с использованием готового полимера не представляется возможным. Эту задачу следует решать, создавая равномерные бездефектные слои полимера на твердой матрице путем непосредственной (прививочной) полимеризации мономера (тетрафторэтилена, ТФЭ) в поверхностных (адсорбционных) слоях. Известны работы, в которых полимеризацию ТФЭ инициировали как активными центрами, возникающими на поверхности исходных материалов в результате облучения [24], так и с помощью вещественных инициаторов (озонидов фторолефинов [25]).

Полимеризация ТФЭ на поверхности неорганических материалов описана в литературе (на-

пример, в [26]), однако на ранних этапах исследований в этой области отсутствовали сведения о морфологии привитого слоя ПТФЭ и, тем более, о возможности получения тонкого, равномерного и однородного покрытия на поверхности пористого материала. Как показали предварительные эксперименты, при прививке из газовой или жидкой фазы прививаемый полимер не образует сплошного слоя, а представляет собой отдельные глобулярные образования гомополимера на поверхности неорганического носителя. Эффективным способом получения привитых полимеров является использование пост-эффекта, т. е. осуществление прививки за счет стабилизировавшихся на твердой подложке активных центров. Для нахождения оптимальных условий синтеза с целью достижения морфологии композита, представленной на рис. 1 б, исследовали четыре различных режима проведения процесса [27]. В качестве подложки использовали макропористое стекло (МПС) со средним диаметром пор 50 нм и средним диаметром частиц 100–150 мкм. Условия прививки ПТФЭ, соответствующие режимам 1–4, приведены в подписи к рис. 3.

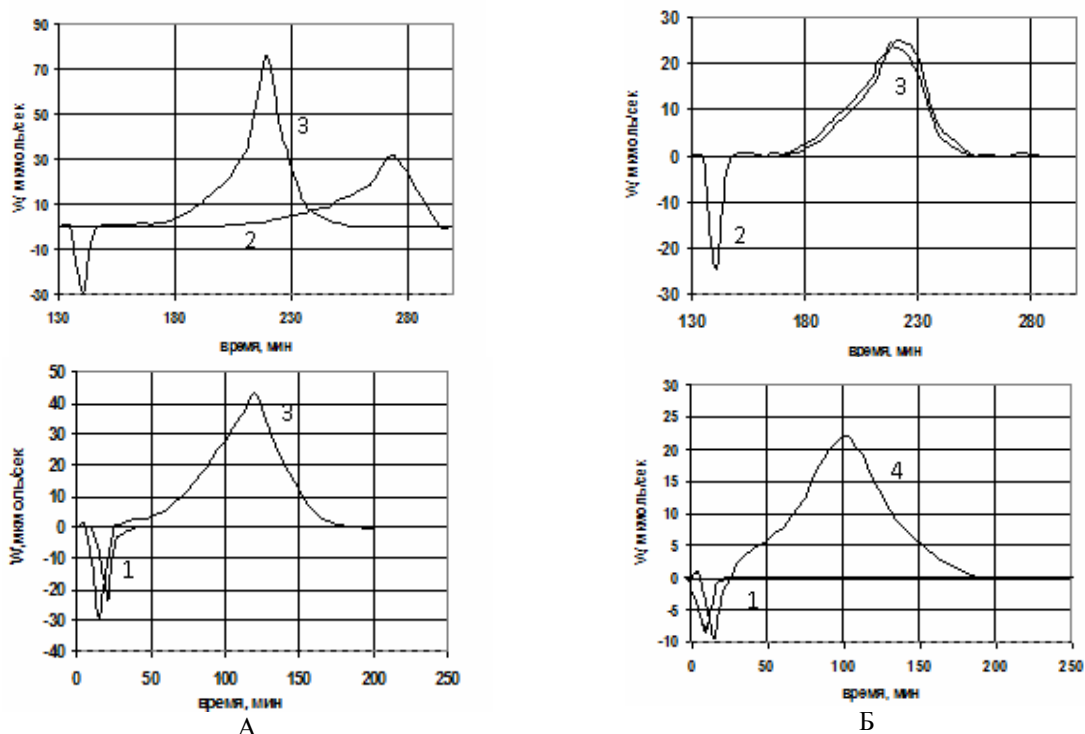


Рис. 3. Калориметрические кривые разогрева образцов МПС + ТФЭ (А) и Al_2O_3 + ТФЭ (Б) при облучении дозой 50 кГр (А) или 0.5 кГр (Б): 1 – сорбция ТФЭ в течение 20 мин при 27°C, без облучения (режим 1); 2 – облучение при 27°C с последующим намораживанием ТФЭ при –196°C (режим 2); 3 – облучение при –196°C с последующим намораживанием ТФЭ при –196°C (режим 3 – «раздельный радиолиз»); 4 – сорбция ТФЭ в течение 20 мин при 27°C, медленное охлаждение, облучение при –196°C (режим 4 – «совместный радиолиз»);

W – скорость тепловыделения.

Типичные калориметрические кривые, полученные при исследовании разных режимов постполимеризации ТФЭ на некоторых неорганических материалах, представлены на рис. 3 а и 3 б. Во всех случаях в ходе прогрева замороженных облученных систем после эндотермического пика плавления мономера при –133°C наблюдается

интенсивный широкий экзотермический пик, соответствующий полимеризации ТФЭ, вплоть до полной конверсии мономера. Радикальная природа полимеризации подтверждается данными ЭПР. Спектр смеси парамагнитных продуктов в γ -облученной при –196°C системе МПС–ТФЭ еще до начала плавления мономера при –168...–153°C пере-

ходит в спектр радикала роста ПТФЭ $\sim \text{CF}_2\cdot\text{CF}_2$, который не изменяется до конца процесса. Концентрация накопленных облучением парамагнитных центров в МПС в отсутствие мономера при размораживании образца практически сохраняется постоянной вплоть до -23°C . В системе МПС–ТФЭ в области плавления мономера до $\sim 75\%$ радикалов гибнет, зато концентрация оставшихся радикалов практически не меняется во всем температурном интервале протекания пост-полимеризации вплоть до комнатной температуры, т. е. полимеризация происходит по механизму «живых» цепей.

Таким образом, полимеризационная прививка заданного количества ПТФЭ на твердую матрицу не представляется достаточно сложной задачей и может быть осуществлена различными способами. Однако, возникает вопрос о том, достигается ли при этом необходимая морфология композита, т. е. образование однородного нанослоя ПТФЭ на поверхности мезопористой матрицы, в том числе на внутренней поверхности пор (см. рис. 1). Ответ на этот вопрос можно получить, анализируя данные порометрии [28]. Оказалось, что композиты, полученные в режимах 1, 2 и 3, не обладают необходимой морфологией (рис. 4 а и 4 б). Несмотря на уменьшение объема пор, средний диаметр пор практически не меняется, возможно появление новых сателлитных максимумов на кривых распределения пор по размерам. Полученные результаты можно объяснить преимущественным образованием полимерного покрытия на внешней поверхности пористых гранул, возникновением полимерных пробок в порах и малой степенью модификации внутренней поверхности пор. Совершенно иной морфологией при том же количестве привитого ПТФЭ обладает материал, полученный в режиме 4 (см. рис. 4 в).

В этом случае как объем, так и средний диаметр пор закономерно уменьшаются. В значительной степени сохраняется исходная пористость материала (структура В). По данным ртутной порометрии можно определить толщину полимерного покрытия, которая, в зависимости от количества введенного ТФЭ, составляет от 1–3 до 5–10 нм. Эти величины соответствуют значениям, рассчитанным исходя из количества привитого полимера и удельной поверхности пор матрицы. Равномерное покрытие, состоящее из фторполимера, эффективно экранирует поверхность носителя, поэтому поверхности синтезированных сорбентов плохо смачиваются как полярными, так и неполярными жидкостями, т. е. становятся антиадгезионными. Аналогичные результаты получены при проведении прививочной полимеризации фтормономеров, инициируемой с помощью предварительной обработки поверхности исходных материалов озоном [28], о чем подробнее будет сказано ниже (см. раздел 1.6).

Таким образом, найденный режим полимеризации позволил решить поставленную задачу «прямого синтеза» композиционного пористого сорбента с заданной морфологией. Не менее важной задачей является введение функциональных групп (амино-, карбоксильных групп и др.) в поверхностный слой привитого ПТФЭ с целью улучшения его смачиваемости в водных средах и присоединения различных биоллигандов. Один из подходов такой функционализации основан на отмеченном выше факте сохранения в полученном пост-полимеризацией ПТФЭ доступных долгоживущих радикалов, сохраняющих реакционную способность, что позволяет «продолжить» химическую модификацию привитого композита, вводя в реакционную систему дополнительный мономер после завершения полимеризации ТФЭ на первой стадии.

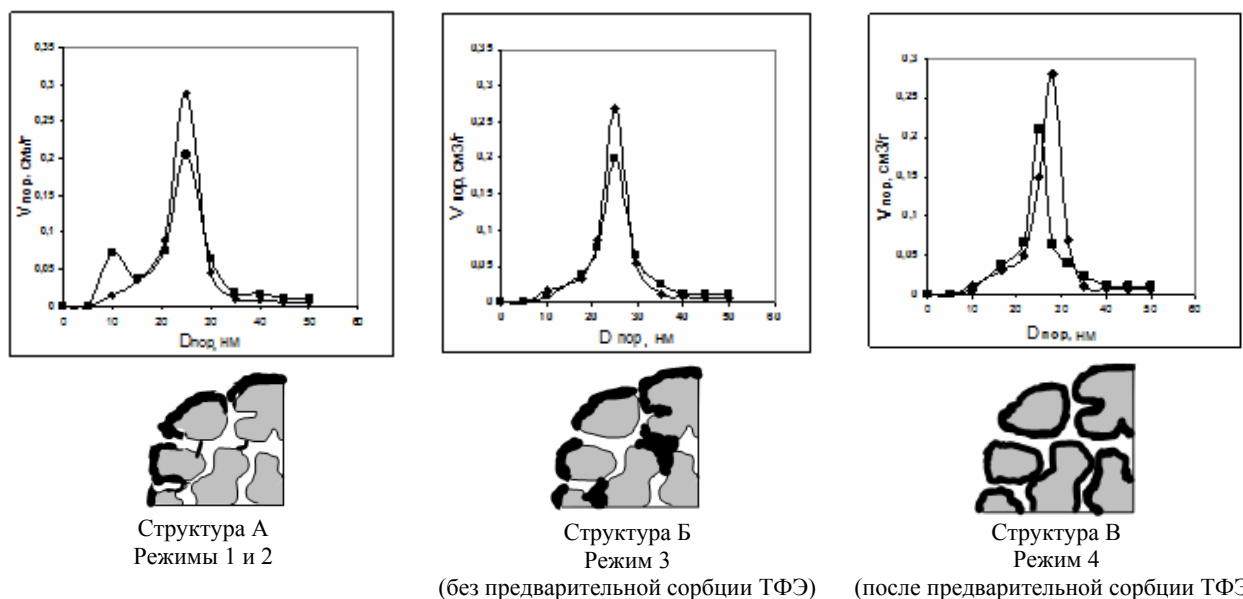


Рис. 4. Дифференциальные кривые распределения пор по размерам для исходного (1) и модифицированного (2) МПС (10% ПТФЭ) и пористая структура полученного материала: А – режим 1 или 2 (в результате сорбции ТФЭ без последующего облучения или без предварительной сорбции ТФЭ, соответственно, структура А); Б – режим 3 (без предварительной сорбции ТФЭ, структура Б); В – режим 4 (с предварительной сорбцией ТФЭ, структура В).

В качестве одного из таких мономеров был выбран аллиламин. Как известно, аллиламин полимеризуется по радикальному механизму с образованием низкомолекулярных олигомеров со степенью полимеризации $n < 10$ [29]. Таким образом, степень прививки полиаллиламина при введении паров аллиамина в контакт с полученной пост-полимеризацией пленкой ПТФЭ относительно невелика ($< 20\%$ от массы привитого ПТФЭ). Однако именно такая прививка не нарушает морфологии слоя ПТФЭ на матрице, позволяя при этом вводить аминогруппы в требуемых концентрациях на химически стойких спейсерах. При этом можно контролировать поверхностную концентрацию доступных аминогрупп, изменяя содержание паров аллиламина в исходной смеси, либо изменяя условия проведения процесса пост-полимеризации. Так, при одновременном введении ТФЭ и аллиламина в реакционную систему, содержащую МПС со средним диаметром пор 50 нм и с удельной поверхностью около $80 \text{ м}^2/\text{г}_{\text{носителя}}$ (т. е. проводя пост-сополимеризацию), удастся получать композиционные материалы с поверхностной концентрацией аминогрупп около $25 \text{ мкмоль}/\text{г}_{\text{носителя}}$ при относительном содержании полимерной фазы в композите 21.5%. Однако, при последовательном введении сомономеров в реакционную систему, содержащую тот же носитель (т. е. при проведении пост-блоксополимеризации), поверхностную концентрацию доступных аминогрупп удастся повысить практически на порядок – до $240 \text{ мкмоль}/\text{г}_{\text{носителя}}$ при незначительном увеличении содержания полимерной фазы в композите – до 24.8%.

1.3. Сорбенты на основе матриц, модифицированных частично фторированными полимерами

Технологические трудности, сопряженные с получением фторполимер-содержащих сорбентов радиационным методом, объясняют появление ряда исследований, связанных с разработкой сорбционных материалов, модифицированных частично фторированными соединениями. Ранние работы в этой области были направлены на изучение взаимодействий различных фторсодержащих фаз (как правило, полученных в результате обработки кремнеземных матриц фторсиланами или другими низкомолекулярными фторсодержащими соединениями) с различными классами органических соединений. В начале 1990-х годов появляются исследования в области создания и изучения свойств композиционных сорбентов, модифицированных частично фторированными полимерами. В работе [30], например, обсуждается способ получения и хроматографические свойства пористого кремнеземного сорбента, модифицированного политрифторстиролом. Полимерный модификатор получали методом радикальной сополимеризации трифторстирола с метилвинилтриэтоксисилоном. По первому способу сорбент получали кипячением суспензии частиц носителя в растворе сополимера в абсолютном толуоле. Остаточные силанольные группы кремнезема обрабатывали гексаметил-

дисилоном. Второй, более сложный способ заключался в последовательной обработке носителя γ -излучением и парами трифторстирола [31]. Оба полученных сорбента демонстрировали сходные сорбционные и хроматографические свойства, которые можно охарактеризовать как промежуточные по отношению к свойствам кремнеземов, модифицированных ПТФЭ, и полистирольных носителей. В обоих случаях материалы отличались высокой гидролитической стабильностью. На основе синтезированных сорбентов был получен ряд ионообменных материалов с различной поверхностной емкостью (от 95 до 300 $\text{мкмоль}/\text{г}$), которые с успехом использовали для разделения пептидов, а также нуклеотидфосфатов.

Альтернативный подход для получения фторполимер-содержащих сорбентов был предложен в работах [20, 21]. Сорбент получали, модифицируя кремнезем частично фторированными олигобутadiенами. Этот способ основан на фторировании предварительно иммобилизованных на поверхности носителя тонких пленок олигомера или полимера *in situ* парами дифторида ксенона в атмосфере инертного газа. Происходящее при этом замещение атомов водорода атомами фтора в полимерной фазе затрагивает и модифицирует поверхностные свойства полимерного покрытия, не затрагивая его объемные свойства. Обычно применяемые методы прямого фторирования основаны на обработке материалов смесью газобразных фтора и азота. Однако фтор токсичен, является коррозионным агентом, поэтому работы с ним требуют тщательного выполнения мер безопасности на каждом этапе. Использование альтернативного фторирующего агента, такого как дифторид ксенона, значительно упрощает процедуру модификации.

На первом этапе модификации по поверхности кремнеземного носителя распределяли однородное тонкое покрытие олигобутadiена, пропитывая частицы пористого кремнезема раствором нефторированного прекурсора в летучем растворителе. Затем систему обрабатывали ультразвуком, растворитель удаляли и полученный материал фторировали. Дифторид ксенона эффективно взаимодействует с поверхностью полибутadiена и модифицирует ее. Фторирование в условиях отсутствия кислорода препятствует образованию полярных групп, присутствие которых может значительно увеличить неспецифическую сорбцию. Было показано, что фторирование полимерного покрытия, иммобилизованного на поверхности кремнезема, сопровождается химическим структурированием полимера (образованием поперечных сшивок) за счет рекомбинации макрорадикалов и взаимодействия радикалов с кратными связями. В результате образуется поперечно-сшитое фторированное полимерное покрытие.

Полученный материал имел сорбционные свойства, аналогичные свойствам ПТФЭ-содержащего сорбента при разделении смесей, содержащих нуклеиновые кислоты и белки (в том числе, при выделении ДНК из лизатов крови).

1.4. Неорганические матрицы, модифицированные нанослоями полианилина и его производных

Наряду с фторполимерами, особый интерес при получении сорбционных композиционных материалов представляют полианилины. Уникальные физико-химические свойства ПАНИ определяют широкое использование ПАНИ-содержащих материалов в различных областях науки и технологии [32]. ПАНИ отличается высокой химической стойкостью, он нерастворим в большинстве известных растворителей. Этот полимер обладает высокими электропроводящими (1000 См/см) [33] и газоразделительными свойствами [34], его можно использовать для защиты

металлических поверхностей от коррозии [35], а также в качестве сенсоров различного назначения [36]. Особенности структуры макромолекулы ПАНИ (рис. 5) позволяют надеяться на возможность эффективного применения ПАНИ-содержащих материалов в биомедицинской области, в частности, при разделении сложных смесей биополимеров [37]. Кроме того, структура макромолекулы ПАНИ обратимо изменяется при изменении pH среды, что позволяет направленно изменять сорбционные свойства ПАНИ-покрытий. Этим определяется актуальность исследований, связанных с определением условий полимеризации анилина, обеспечивающих получение однородных нанотолщинных нерастворимых ПАНИ-покрытий на различных поверхностях.

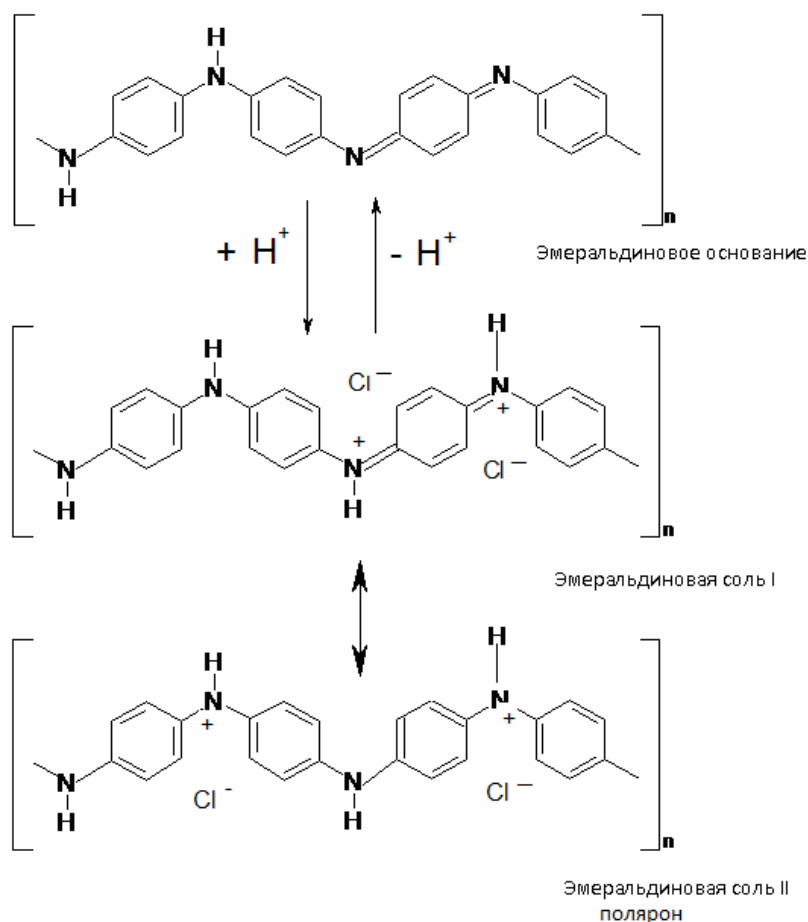


Рис. 5. Формы полианилина.

ПАНИ получают химическим [38] или электрохимическим [39] окислением анилина. Химическая полимеризация анилина в кислой среде в присутствии твердой поверхности часто приводит к образованию тонких полимерных покрытий [40–42], однако механизм образования таких покрытий в фазово-неоднородной системе не вполне ясен. Можно предположить, что эти пленки формируются в результате осаждения и последующего закрепления образующихся в процессе полимеризации анилина полимерных наночастиц на поверхности носителя. Возможность нанесения ПАНИ на пористые матрицы методом химического поверхностного осаждения была показана ранее [41, 42]. Однако, получение

однородных, прочно связанных с поверхностью пленок ПАНИ на поверхности твердых (пористых) носителей при таком осадительном механизме формирования пленки осложняется параллельно протекающим накоплением значительного количества частиц полимера в объеме реакционной среды. Эти частицы затем оседают на поверхность матрицы, слабо удерживаясь на ней и загрязняя тем самым сорбент. Последнее обстоятельство существенно усложняет процедуру отмывки получаемого композита, особенно в случае использования пористых матриц. По аналогии с синтезом фторполимерсодержащих сорбентов, выход может быть найден при локализации процесса синтеза макромолекул ПАНИ в поверхностных

слоях носителя при одновременном прочном связывании образующегося ПАНИ с поверхностью. Поэтому на первом этапе было исследовано влияние пористых матриц с развитой поверхностью на кинетику и механизм химической полимеризации анилина.

Как известно, механизм окислительной полимеризации сложен, и, несмотря на большое число публикаций на эту тему [38, 42], до сих пор остается предметом дискуссий. Однако, общепризнанно, что первым этапом реакции является протонирование мономера, затем следует окисление протонированного анилина с получением ион-радикала, образование димеров и олигомеров различной структуры и, наконец, формирование различных форм твердого нерастворимого полимера. Данный процесс отличается наличием индукционного периода, имеет автокаталитический характер и обычно сопровождается замедлением и прекращением реакции еще до полного исчерпания мономера. На рис. 6 приведены типичные кинетические кривые полимеризации анилина, построенные как по расходу мономера, так и по накоплению полимера. Их хорошая корреляция, а также отсутствие в спектрах реакционной смеси пиков, соответствующих олигомерам анилина, свидетельствуют о том, что при мольном соотношении мономер–допант–окислитель, равном 1:3:1, концентрации промежуточных продуктов очень низки. S-образный вид кинетических кривых указывает на автокаталитический характер процесса образования макромолекул ПАНИ, что, в частности, обсуждалось ранее в работе [43]. Непосредственным доказательством автокатализа полимером служит тот факт, что при добавлении в реакционную систему навески ПАНИ непосредственно после смешивания раствора мономера с раствором окислителя, наблюдается изменение формы кинетической кривой полимеризации. При этом продолжительность индукционного периода сокращается, на кривой убыли мономера появляется вторая ступень, а продолжительность индукционного периода линейно убывает в зависимости от массы добавляемого ПАНИ.

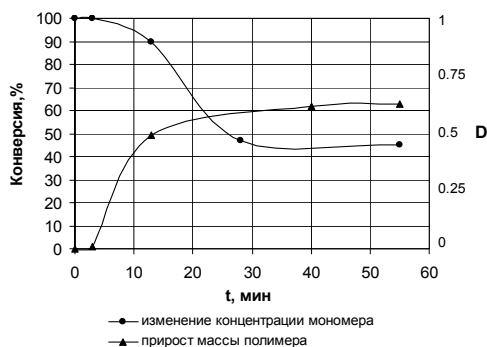


Рис. 6. Прирост массы полимера и убыль мономера в процессе полимеризации анилина при мольном соотношении мономер–кислота–окислитель 1:3:1. Начальная концентрация анилина $0.02 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$.

Автокаталитическое действие полимера на процесс полимеризации, по-видимому, опреде-

ляется тем, что электронные переносы, приводящие к образованию катион-радикалов анилина, происходят на поверхности полианилиновых частиц, поэтому скорость полимеризации в поверхностном слое увеличивается, чему соответствует наличие первой ступени на кривой убыли мономера (рис. 7, кривая 2). Последующее снижение скорости полимеризации связано с прекращением эффективного каталитического действия добавленных частиц ПАНИ по мере их «зарастания» вновь образовавшейся полимерной пленкой. В дальнейшем полимеризация протекает преимущественно на частицах «свежего» ПАНИ, образующихся в объеме реакционной системы, что, по-видимому, является причиной появления второй ступени на кинетической кривой (рис. 7, кривая 2). Таким образом, при модификации поверхности носителя ПАНИ важно получить первый слой полимера, причем образование последующих слоев будет катализироваться предыдущими слоями. Очевидно, что природа поверхности используемого носителя может оказывать заметное влияние на характер полимеризации.

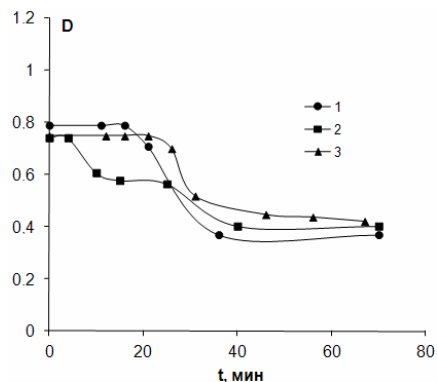


Рис. 7. Убыль мономера при полимеризации анилина: 1 — в отсутствие носителя; 2 — при добавлении 0.01 г полианилина; 3 — в присутствии 1 г МПС при соотношении мономер–кислота–окислитель 1:3:1. Начальная концентрация анилина $0.02 \text{ моль} \cdot \text{л}^{-1}$.

Присутствие макропористого стекла (МПС) практически не изменяет вид кинетической кривой полимеризации анилина (рис. 7, кривая 3), наблюдаемой в отсутствие носителя. Это означает, что поверхность кремнезема не оказывает каталитического действия на полимеризацию анилина, так как силанольные группы МПС в кислой среде, по-видимому, не являются достаточно сильными центрами сорбции образующихся продуктов полимеризации. В результате ПАНИ образуется не только на поверхности кремнезема в виде покрытия (пленки), но также и в объеме реакционной смеси в виде взвеси полимерных частиц. Так, в случае полимеризации анилина в присутствии МПС до 40% введенного в систему анилина расходовалось на образование взвеси частиц ПАНИ.

Необходимость протонирования анилина на первой стадии окислительной полимеризации наводит на мысль о том, что в качестве матриц должны выступать твердые нерастворимые поликислоты (кислые катионообменники). Поэтому в

качестве носителей было предложено использовать кремнеземы, модифицированные полимерами с различным содержанием сульфогрупп на поверхности. Для получения таких носителей в одном из вариантов исходный кремнезем сначала модифицировали ПТФЭ, на который затем прививали полистирол с дивинилбензолом методом радиационной пост-блоксополимеризации. Полученный таким образом полистиролсодержащий кремнезем сульфировали концентрированной серной кислотой, варьируя при этом продолжительность сульфирования [43].

Было показано, что при полимеризации анилина в присутствии поверхностно-сульфированных носителей индукционный период полимеризации практически исчезает по сравнению с полимеризацией в отсутствие носителя. Кроме того, несмотря на то, что полимеризацию при этом проводили в присутствии соляной кислоты, взятой в недостатке (соотношение мономер–допant–окислитель составляло 1:0.9:1), для всех исследованных образцов было характерно синее окрашивание реакционной системы, что указывало на образование эмеральдиновой соли ПАНИ. При этом не наблюдали образования частиц ПАНИ в объеме реакционной системы. Максимальный выход полимера наблюдали при использовании носителя с максимальной концентрацией ($0.109 \text{ ммоль/г}_{\text{носителя}}$) сульфогрупп на поверхности.

Морфологию полученных композитов изучали методом ртутной порометрии. Сравнение порогам образцов ПАНИ-содержащих сорбентов на основе сульфированного кремнезема (МПС-ПС-ПАНИ) с порогамми исходного МПС, предварительно модифицированного сульфированным полистиролом (МПС-ПС), показало, что пористость исходного носителя сохраняется, а толщина полианилинового покрытия составляет около 3 нм. Одновременное сопоставимое уменьшение удельного объема пор и среднего эффективного диаметра пор свидетельствует о том, что при окислительной полимеризации анилина в присутствии сульфостирол-содержащего объемно-пористого кремнезема тонкий слой ПАНИ образуется не только на внешней поверхности частиц носителя, но и на внутренней поверхности пор.

Эффект экранирования неорганической поверхности полимерной фазой подтверждается данными по устойчивости модифицированного кремнезема к гидролизу кремний-кислородных связей Si–O–Si по сравнению с немодифицированным кремнеземом в щелочных средах. Кинетические кривые растворения, полученные для исходного и модифицированного образцов кремнезема, представлены на рис. 8. По сравнению с немодифицированным кремнеземом, ПАНИ-содержащий материал на основе сульфированного кремнезема обладал повышенной стабильностью в условиях щелочного гидролиза. Таким образом, была показана возможность нанесения практически бездефектных слоев ПАНИ на поверхность модифицированных кремнеземных носителей с поверхностными сульфогруппами.

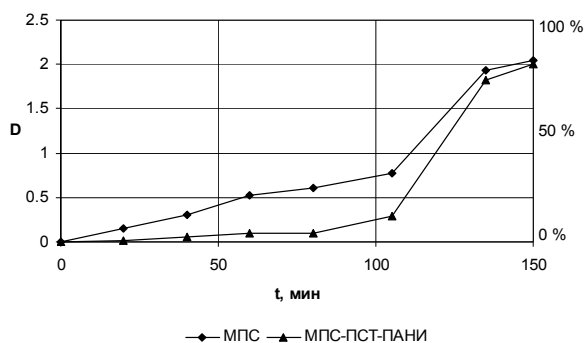


Рис. 8. Кинетические кривые растворения МПС и МПС-ПС-ПАНИ в боратном буфере, pH 9.5.

Важной задачей является придание слою ПАНИ дополнительной функциональности за счет введения различных функциональных групп: карбоксильной, нитро-, метильной и др. Модификация функциональными группами сформированного на твердой подложке ПАНИ не представляется возможным, поэтому поверхность кремнезема модифицировали сополимерами анилина с *м*-аминобензойной кислотой, *п*-нитроанилином или *о*-толуидином. В частности, при модификации кремнезема сополимерами анилина с *м*-аминобензойной кислотой было показано, что устойчивое покрытие образуется только в случае преобладания в сополимере звеньев анилина. При повышении содержания карбоксильных групп сополимеры становятся растворимыми в воде при щелочных значениях pH. Поэтому с целью получения поверхности с повышенным содержанием карбоксильных групп, полимерное покрытие получали хемосорбцией активированной карбодимидом поли-*м*-аминобензойной кислоты на поверхности силаминированного кремнезема (аналогично схеме, представленной на рис. 2 для процесса хемосорбции поли-*п*-нитрофенилакрилата). Полученный композит оказался устойчивым в щелочных средах. Таким образом, была продемонстрирована возможность варьировать свойства ПАНИ-поверхности за счет введения различных функциональных групп, что позволяет решать определенные хроматографические и аналитические задачи (см. раздел 2).

1.5. Окислительная полимеризация анилина на поверхности кремнезема в присутствии полисульфокислот

Одним из эффективных способов локализации процесса полимеризации анилина на поверхности носителя является матричная полимеризация. В основу данного подхода были положены, с одной стороны, результаты исследований свойств ПАНИ-содержащих сорбентов на основе кремнеземов, модифицированных сульфированным полистиролом, а с другой стороны, работы по матричному синтезу поликомплексов ПАНИ с растворимыми полисульфокислотами [44–46]. Матричная полимеризация [47–49] характеризуется эффективным подходом к управлению как кинетикой и механизмом процесса, так и строением образующегося полимера. Продуктами полиме-

ризации являются поликомплексы исходной «матрицы» и образующегося полимера. Последние, как показано в работах [50–52], фактически можно рассматривать как новые полимерные материалы со свойствами, существенно отличающимися от свойств образующих их полимеров. Эти принципы были положены в основу получения композиционных биосорбентов, в которых в качестве модификатора пористого кремнезема нанослоями полимеров были использованы продукты матричной окислительной полимеризации анилина на ароматических полисульфокислотах.

В работе [53] исследовали матричный синтез ПАНИ в присутствии поли(*n,n'*-(2,2'-дисульфокислота)дифениленизофталамида (*изо*-ПСК) и поли(*n,n'*-(2,2'-дисульфокислота)дифенилентерефталамида (*тере*-ПСК). При этом получали поликомплексы, обладающие хорошей адгезией к различным поверхностям (металл, стекло). Исследовали два варианта модификации: полимеризацию анилина в присутствии силанированного стекла, предварительно покрытого ПСК, а также модификацию силанированного стекла готовыми комплексами поликислоты с ПАНИ.

В качестве исходной матрицы для получения композиционного сорбента применяли объемно-пористый кремнезем (МПС), который предварительно силанировали 3-аминопропилтриэтоксисиланом. Было показано, что наличие аминогрупп на поверхности кремнезема обеспечивает эффективную сорбцию полисульфокислот. На рис. 9 представлена кинетика сорбции *изо*- и *тере*-ПСК из разбавленного водного раствора на поверхности силанированного кремнезема. Полученные покрытия оказались устойчивы к действию различных растворителей (метанол, водный раствор соляной кислоты). Видно, что степень сорбции *изо*-ПСК выше, чем *тере*-ПСК. Однако, в отличие от индивидуальной кислоты, а также поликомплекса *изо*-ПСК-ПАНИ, поликомплекс *тере*-ПСК-ПАНИ на силанированном кремнеземе не сорбируется. По-видимому, этот эффект связан с различиями в строении интерполимерных комплексов ПАНИ с *изо*- и *тере*-ПСК, поскольку в первом случае образуется двутаяжная структура, а во втором – гребнеобразная структура комплекса, и ПАНИ взаимодействует со всеми сульфогруппами в молекуле поликислоты. В случае модификации носителя комплексами *изо*-ПСК-ПАНИ степень сорбции комплексов увеличивается с повышением содержания протонированных сульфогрупп. Полученные покрытия на основе поликомплексов также оказались стабильными в различных средах.

В пользу выбора ПСК в качестве сомодификаторов носителей при получении ПАНИ-содержащих сорбентов свидетельствуют данные о кинетике образования в объеме реакционной смеси полимерных частиц и их распределении по размерам. Полимеризацию анилина осуществляли в присутствии немодифицированного кремнезема при мольном соотношении мономер–HCl–окислитель 1:3:1 и в присутствии мо-

дифицированного *изо*-ПСК кремнезема при мольном соотношении мономер–окислитель 1:1. В первом случае через 20 мин от начала полимеризации в объеме образуются крупные частицы диаметром около 3000 нм (по данным метода корреляционно-лазерной спектроскопии). При использовании сульфированного силанированного кремнезема наблюдаются только мелко-дисперсные частицы диаметром около 3 нм. При своевременном удалении супернатанта наличие указанных частиц не влияет на качество получаемого сорбента.

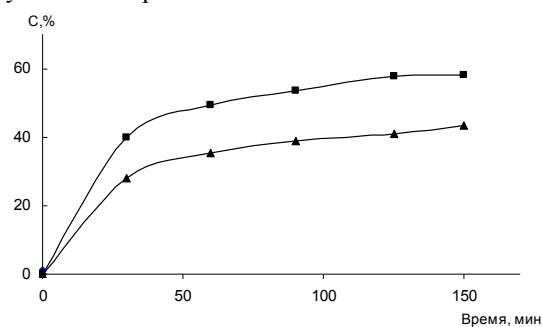


Рис. 9. Кинетика сорбции *тере*-ПСК (1) и *изо*-ПСК (2) на силанированном кремнеземе (0.32 ммоль/г). Начальная концентрация ПСК (7.3 мг/мл) принята за 100%.

При образовании комплексов *изо*-ПСК-ПАНИ при разном соотношении анилина и ПСК оптимальным является соотношение 1:1, поскольку в этом случае наблюдается максимальная конверсия мономера (60%). Полученные комплексы осаждали различными органическими растворителями, причем степень выпадения комплекса изменялась в ряду диоксан > ацетон >> метанол. Полученные комплексы в сухом виде практически не растворяются в органических растворителях (кроме ДМФА), однако хорошо растворяются в воде.

Состав комплексов ПСК-ПАНИ исследовали методом ИК-спектроскопии. На всех спектрах, за исключением спектра ПАНИ, присутствовали пики, относящиеся к группам $-\text{SO}_3\text{H}$ (1000 см^{-1}) и $>\text{C}=\text{O}$ ($1850\text{--}1650\text{ см}^{-1}$), а также полосы, соответствующие связи $-\text{Ph}-\text{NH}-$ ($\equiv\text{C}-\text{NH}$, около 1150 см^{-1}).

Сорбционные свойства ПАНИ-содержащих сорбентов, полученных с использованием полисульфокислот, оказались аналогичными свойствам ПАНИ-содержащего сорбента на основе кремнезема, модифицированного сульфированным полистиролом. С технологической точки зрения способ, основанный на применении поликомплексов ПАНИ с сульфокислотами, значительно проще и позволяет использовать готовый, заранее полученный полимерный модификатор. Однако, в некоторых случаях практическое применение *изо*-ПСК-ПАНИ-модифицированного сорбента малоэффективно. Так, было найдено, что очищенные препараты ДНК, выделенные из бактериальных лизатов с помощью картриджей, упакованных этим сорбентом, можно эффективно анализировать методом ПЦР только непосредственно после их выделения, так как полученные препара-

раты ДНК разрушаются при хранении в течение нескольких часов. Этот эффект удалось преодолеть, заменив *изо*-ПАСК на структурно более однородную полистиролсульфокислоту, что позволило выделять стабильные при хранении препараты очищенной ДНК.

1.6. Озон-иницированная полимеризация как новый способ получения полимермодифицированных композитов

Одной из практических задач в области получения полимерсодержащих композиционных сорбентов является разработка «универсального» подхода к синтезу хроматографических материалов на основе пористых кремнезёмов, модифицированных нанослоями таких разных полимеров, как политетрафторэтилен и полианилин. Для этой цели требуется «универсальный» подход, обеспечивающий активацию твердой матрицы. Как известно, химическая обработка озonom различных материалов приводит к активации их поверхности за счет образования различных пероксидных групп и/или озонидов [54]. Несмотря на то, что кремнезём сам по себе не вступает в реакцию с озоном, кремнезёмные матрицы, как правило, содержат различные примеси, в частности, оксиды железа или алюминия (в среднем, от 0.5 до 3.5% в зависимости от условий получения кремнезёма). Такие примеси, в принципе, могут образовывать под действием озона различные ионные или ион-радикальные химические структуры и затем инициировать полимеризацию различных мономеров. Этот эффект детально до сих пор не исследован. Поэтому первым шагом в данном направлении стала оценка эффективности использования активированного озона кремнезёма в качестве гетерогенного инициатора полимеризации мономеров различного химического строения (таких как фторомономеры, анилин и т. д.).

Действительно, после обработки образцов кремнезёма озном с последующим удалением не адсорбированного озона и других газообразных продуктов, с помощью йодометрического титрования было показано, что на поверхности кремнезёма образуются пероксидные структуры. Количество определяемых при этом пероксидов прямо зависит от природы кремнезёмного носителя и весьма незначительно в «чистых» кремнезёмных образцах, однако заметно возрастает в образцах, содержащих значительную долю примесей (преимущественно оксидов железа). Так, например, из зависимости концентрации образующихся поверхностных пероксидных групп от продолжительности озонирования матрицы и расхода озона, экспериментально полученной для образца кремнезёма, содержащего около 3.5% оксидов железа (Si-500, ЗАО «Химтех», Армения), следует, что оптимальная продолжительность озонирования составляет 4 ч при расходе смеси озон–воздух 5 л/ч. Дальнейшее увеличение продолжительности озонирования не приводит к росту концентрации пероксидных групп. Образующиеся при этом пероксиды сохраняются при комнатной температуре, по крайней мере, в течение месяца. Таким

образом, кремнезёмные матрицы, обработанные озоном, можно подвергнуть дальнейшему тестированию в качестве гетерогенного инициатора, обеспечивающего модифицирование его поверхности в результате прямой полимеризации различных мономеров, протекающей по различным механизмам.

Применимость кремнезёмных носителей, предварительно обработанных озоном, для получения композиционных сорбентов, модифицированных полимерными покрытиями, была продемонстрирована на примерах осуществления радикальной полимеризации ТФЭ (с использованием образующихся поверхностных радикалов) и окислительной полимеризации анилина (с использованием поверхностных пероксидов).

Было показано, что инкубирование озонированного кремнезёма в присутствии ТФЭ при комнатной температуре приводит к полимеризации этого газообразного мономера на поверхности носителя. Выход полимера (ПТФЭ) при этом находится в зависимости от содержания оксидов железа в кремнезёме. В частности, материал, полученный на основе макропористого стекла марки Proligo-500 (Proligo Biochemie GmbH), содержал 8–11.5% полимерной фазы (от общей массы композита), в то время как материал, полученный на основе кремнезёма Si-500 (ЗАО «Химтех», Армения), содержал 21.0–25.5% иммобилизованной полимерной фазы. С целью повышения смачиваемости и селективности получаемых материалов в процессах разделения нуклеиновых кислот, оба типа носителей модифицировали сополимерами ТФЭ с аллиламином или аллиловым спиртом (для введения дополнительных функциональных групп), а также гексафторпропиленом (ГФП) (для стабилизации радикалов на концах растущих цепей ПТФЭ [55]), подобно тому, как это делалось при использовании радиационной технологии. Сополимеры вводили либо одновременно в виде смеси ТФЭ с соответствующим мономером в паровой фазе, либо в режиме постполимеризации, вводя второй мономер после завершения полимеризации ТФЭ на первом этапе модификации. В последних случаях в полученных композитах было определено повышенное содержание поверхностных amino- или гидроксильных групп.

ТФЭ, аллиламин и аллиловый спирт полимеризуются только по радикальному механизму. Следовательно, озонированный кремнезём можно рассматривать в качестве эффективного гетерогенного радикального инициатора. Фактически, используя озонированный кремнезём, можно полимеризовать и другие мономеры, полимеризующиеся по радикальному механизму, в частности, стирол, акриламид и т. д. Вместе с тем, чтобы однозначно ответить на вопрос об эффективности дальнейшего использования полученных таким образом композиционных материалов в качестве хроматографических сорбентов, прежде всего необходимо убедиться в совершенстве их морфологии, а именно, насколько равномерно поли-

мерное покрытие распределено по поверхности пористого носителя. Сравнение ртутных порогам образцов кремнезема до и после модификации показало, что исходное распределение пор по размерам после модификации в значительной степени сохраняется, несмотря на то, что диаметр пор уменьшается за счет толщины образованного полимерного покрытия. Сходные морфологические характеристики были получены ранее для образцов МПС, модифицированных слоем ПТФЭ в результате радиационной пост-полимеризации ТФЭ [19, 25, 55]. Равномерность распределения полимерного покрытия по поверхности носителя подтверждается данными теста на стабильность полученных материалов в условиях щелочного гидролиза (образцы выдерживали 15 ч в растворе 0.01 М NaOH, pH 12). Гидролитическая стабильность полученного композита в 10 раз превышает стабильность немодифицированного кремнезема.

Эффективность использования озонированного кремнезема в качестве гетерогенного инициатора полимеризации также была продемонстрирована при проведении окислительной полимеризации анилина в отсутствие традиционных для таких систем окислителей, растворимых в реакционной среде. Последние, как правило, приводят к образованию частиц ПАНИ в объеме реакционной смеси, которые затем оседают на подложку [39, 43]. Последнее обстоятельство усложняет процедуру отмывки конечного продукта. Можно предположить, что гетеропероксиды, иммобилизованные на поверхности озонированного носителя, могут инициировать процесс окислительной осадительной полимеризации анилина, в результате чего будет получаться сорбент, модифицированный связанным с поверхностью слоем полимера.

Как оказалось, при инкубировании озонированного кремнезема в подкисленном водном растворе анилина, не содержащем низкомолекулярного окислителя, ПАНИ образуется только на поверхности носителя. Полученные результаты иллюстрирует рис. 10. Левая колонка на рисунке относится к случаю традиционной окислительной полимеризации анилина, когда мономер, окислитель (например, персульфат аммония) и допант (низкомолекулярная кислота) используют в качестве компонентов реакционной смеси. Видно, что при этом в надосадочной жидкости образуется значительное количество полимерных частиц. Фотографии в правой колонке, напротив, демонстрируют, что ПАНИ образуется только в виде покрытия на поверхности частиц носителя, а взвесь полимерных частиц в реакционном объеме отсутствует. Можно предположить, что пероксидные центры на поверхности носителя служат в качестве центров полимеризации, и последующий рост макромолекул ПАНИ происходит в адсорбционном слое при поверхности носителя.

Равномерность образующегося ПАНИ-покрытия также подтверждается данными ртутной порометрии и тестом на гидролитическую

стабильность. Ртутная порограмма предварительно озонированного кремнезема, покрытого слоем ПАНИ, весьма похожа на порограмму образца, покрытого слоем ПТФЭ. Измеренные толщины полимерного покрытия составляют, в среднем, 8.5 нм. Значительное увеличение стабильности материала в условиях щелочного гидролиза (в 7 раз по сравнению с немодифицированным носителем) также позволяет утверждать, что морфология полученного композиционного материала соответствует схеме, представленной на рис. 1 б. Другими словами, это означает, что бездефектное полимерное покрытие образуется как на внешней поверхности частиц носителя, так и на внутренней поверхности пор.

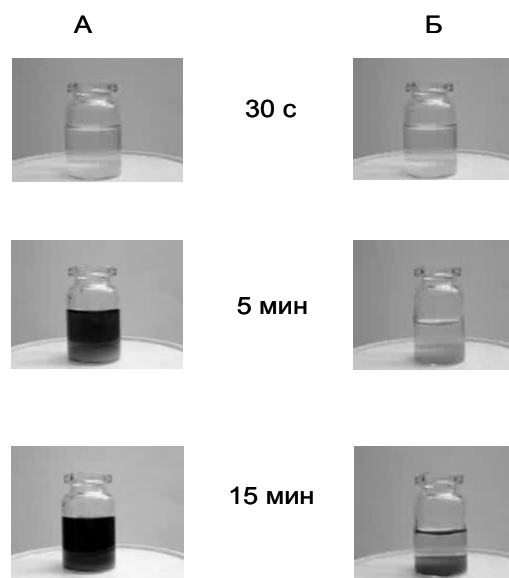


Рис. 10. Сравнение различных способов проведения полимеризации анилина: А – окислительная полимеризация в присутствии немодифицированного кремнезема; Б – полимеризация на поверхности кремнезема, предварительно обработанного озоном.

Таким образом, предложенный подход к химической активации поверхности кремнеземных материалов озоном обеспечивает «универсальный», относительно простой и воспроизводимый способ модификации поверхностных свойств кремнезема посредством химического нанесения однородных нанопокровов таких химически различных полимеров как ПТФЭ и ПАНИ.

Полученные композиционные материалы были протестированы в качестве сорбентов для разделения биополимеров.

2. Применение композиционных полимерсодержащих сорбентов в биосепарации макромолекул

Разнообразие полимерных наноструктур, получаемых в результате проведения различных макромолекулярных реакций в поверхностных слоях твердых матриц, определяет широту областей применения получаемых композиционных материалов, что можно наглядно продемонстрировать, в частности, на примерах разделения и очистки биополимеров (нуклеиновых кислот и белков).

2.1. Применение композиционных фторполимер- и ПАНИ-содержащих материалов для выделения и очистки биополимеров

Биосепарационное поведение ПТФЭ-содержащих материалов на основе кремнезема иллюстрирует типичная хроматограмма смеси, содержащей плазмиду *pBR 322* из *E. coli*, РНК и сопутствующие белки (рис. 11). Видно, что ДНК выходит с колонки 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 водно-органическим элюентом. Полученную смесь белков можно затем разделить в режиме обращеннофазовой ВЭЖХ на колонке, упакованной тем же сорбентом. Механизм удерживания индивидуальных белков при использовании ПТФЭ-содержащих сорбентов сходен с механизмом удерживания при использовании классических C_{18} -фаз [55]. Однако, за счет заметного уменьшения объемов элюирования в первом случае осуществляется «быстрое» хроматографирование при значительной экономии элюента. Таким образом, фторполимер-содержащие композиционные сорбенты эффективны как при разделении нуклеиновых кислот, так и белков. Высокая селективность фторированных полимеров является их общим свойством и определяется очень низкой поверхностной энергией фторполимерных покрытий [56].

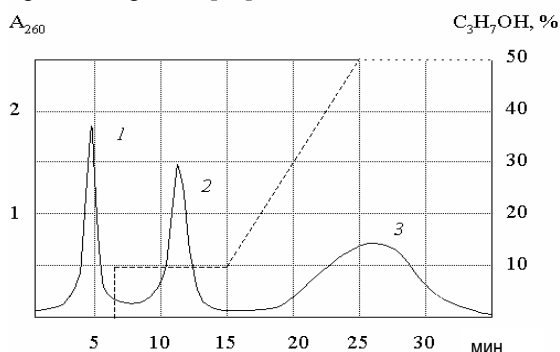


Рис. 11. Очистка плазмиды *pBR 322* из *E. coli* от РНК и сопутствующих белков на колонке, упакованной носителем Trisopor™-500, модифицированным ПТФЭ (250×4.6 мм) (сорбент получен методом радиационной пост-полимеризации в присутствии носителя). Элюент 0.01 М Трис-НСl (рН 7.5–8.2); градиент: 0–50% *n*-пропанола в течение 18.5 мин; скорость элюции 100 мкл/мин. 1 – плазмида; 2 – РНК; 3 – белки.

Сходным образом при разделении смесей, содержащих нуклеиновые кислоты и белки, ведут себя кремнеземы, модифицированные ПАНИ. Однако, благодаря рН-чувствительности ПАНИ-покрытия, такие сорбенты обеспечивают ощутимое преимущество при разделении белковых смесей, которое заключается в том, что для эффективного разделения смесей белков не требуется добавлять органические компоненты в подвижную фазу (элюент). Типичный пример разделения модельной смеси белков в градиенте рН подвижной фазы представлен на рис. 12.

На хроматограмме видно, что белки выходят с колонки в зависимости от значения их изоэлектрической точки. Механизм обратимой сорбции белков на поверхности ПАНИ-покрытия сложен и, по-видимому, объясняется ионными взаимодействиями заряженных групп сорбата с заряженными участками поверхности сорбента, обратимо связывающей белковые молекулы посредством водородных связей [57].

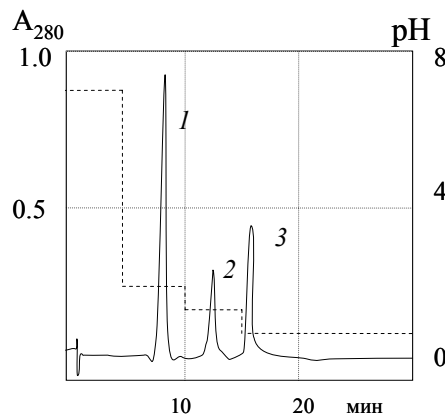


Рис. 12. Разделение смеси белков на колонке (150×5 мм), упакованной МПС, модифицированным ПАНИ, в градиенте рН (7.0–1.0): скорость элюции: 0.25 мл/мин; раствор А – деионизованная вода; раствор В – 0.015 М соляная кислота; градиент: 0–55% раствора В в течение 30 мин. 1 – лизозим (рИ 11; R_t 10.9 мин); 2 – миоглобин (рИ 7; R_t 12.5 мин); 3 – цитохром *c* (рИ 5.6; R_t 14.3 мин).

Поскольку традиционная колоночная хроматография является относительно медленным процессом и требует применения высоких давлений и специального оборудования, более эффективной представляется современная методология разделения компонентов биологических смесей с помощью компактных спин-картриджей (микроколонок), что позволяет проводить биосепарацию в автоматическом режиме в течение нескольких минут. Исключительно высокая сорбционная емкость и селективность фторполимер- и ПАНИ-содержащих сорбентов позволяет использовать картриджи, содержащие 60–150 мг сорбента и разделять нуклеиновые кислоты и белки, не изменяя состав элюента (или даже в отсутствие такового), в одну стадию. Следующие примеры иллюстрируют эффективность применения таких картриджей для выделения ДНК из различных модельных смесей, а также из природных источников (бактериальные лизаты, лизаты растительной ткани, лизаты крови человека и животных и др.).

Для повышения эффективности выделения нуклеиновых кислот образцы, как правило, предварительно лизируют, обрабатывая различными агентами, способствующими высвобождению нуклеиновых кислот. Таким образом, лизаты содержат ДНК, фрагменты РНК, белки, пептиды, полисахариды, ПАВ, соли и т. д. Тестировали ПТФЭ- и ПАНИ-содержащие сорбенты, полученные на основе макропористого стекла Trisopor™-500. На картриджи наносили по 100–200 мкл лизата, картриджи инкубировали 3 мин при комнатной температуре и центрифугировали

1 мин при 0.24 kg. На рис. 13 представлена электрофореграмма образцов ДНК в 1% агарозном геле, выделенных с использованием ПТФЭ-сорбента из лизатов грамположительных и грамотрицательных культур (соответствующие дорожки на электрофореграмме отмечены прописными буквами). Для сравнения на гель наносили ДНК-содержащие элюаты, выделенные из тех же бактериальных культур с использованием коммерческих картриджей фирмы Qiagen (дорожки отмечены строчными буквами). Можно видеть, что элюаты, полученные при использовании фторполимерного сорбента, представляют собой очищенную от белка ДНК с высоким выходом (до 90%). Элюаты, полученные при использовании картриджей фирмы Qiagen, также содержат ДНК, однако ее выходы ниже и в некоторых случаях на электрофореграмме заметны примеси РНК. Следует отметить, что процесс выделения ДНК с использованием картриджей, упакованных ПТФЭ-и ПАНИ-сорбентами, занимает 3–5 мин (с момента приготовления лизата), в то время как многостадийный процесс выделения ДНК на картриджах фирмы Qiagen требует, в среднем, около 30 мин.

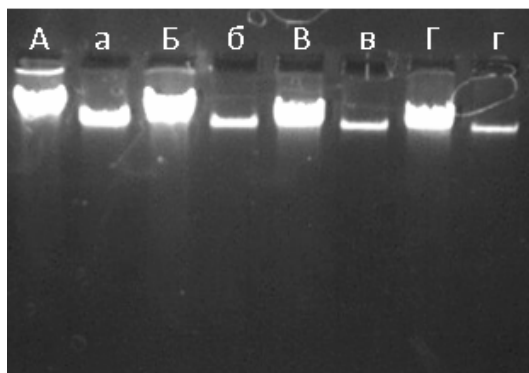


Рис. 13. Электрофореграмма образцов ДНК в 1% агарозном геле, выделенных с использованием ПТФЭ-сорбента из лизатов бактериальных клеток: А/а – *Escherichia coli*; Б/б – *Bacillus subtilis*; В/в – *Listeria monocytogenes*; Г/г – *Staphylococcus aureus*. Прописные буквы – очистка с использованием ПТФЭ-содержащего сорбента; строчные буквы – очистка с использованием коммерческих картриджей, упакованных не содержащим фторполимер сорбентом.

Высокая степень очистки ДНК от белков подтверждается, в частности, возможностью непосредственного использования полученной ДНК в ПЦР-анализе, так как известно, что фермент *Taq*-полимеразы, обеспечивающий амплификацию ДНК, легко ингибируется даже в присутствии незначительных количеств примесей, в больших концентрациях содержащихся в исходном лизате. На рис. 14 можно видеть ампликоны, полученные в результате проведения ПЦР с использованием бактериальной ДНК, выделенной на картриджах, содержащих ПТФЭ-сорбент (треки 5, 6) и картриджами, упакованными МПС, модифицированным отвержденным полифторбутадиеном (ПФБД) в результате обработки олигобутиадена парами дифторида ксенона по методике, приведенной в [20, 21] (треки 3, 4).

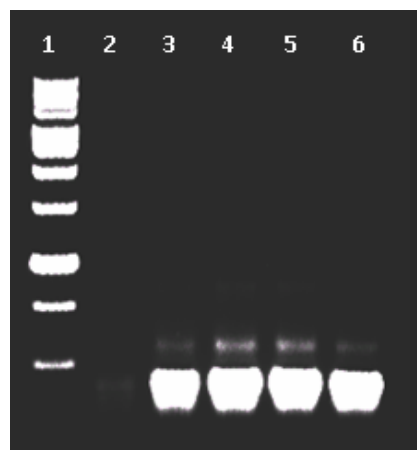


Рис. 14. Сравнение эффективности ПЦР при использовании образцов ДНК из лизатов клеток *E. coli*, выделенных с помощью картриджей, упакованных ПФБД- (дорожки 3–4) и ПТФЭ-модифицированным сорбентом на основе на основе макропористого стекла Trisopor™-500 (дорожки 5–6). 1 – ДНК маркер; 2 – отрицательный контроль.

Аналогичные результаты были получены при использовании ПАНИ-содержащих сорбентов на основе того же неорганического носителя. Содержание ДНК в элюате, полученном при использовании ПАНИ-содержащего сорбента, незначительно отличалось от содержания ДНК в исходном лизате и в элюате, полученном после фенол-хлороформной экстракции. Однако, содержание ДНК в элюате, полученном после многостадийной процедуры выделения с помощью картриджа фирмы Qiagen, оказалось заметно ниже. Так же, как в случае использования фторполимер-содержащих сорбентов, применение ПАНИ-модифицированных кремнезёмов позволяет получать препараты ДНК, пригодные для непосредственного проведения ПЦР-анализа.

Использование сорбентов, поверхность которых покрыта тонким слоем ПАНИ, дает также возможность реализовать преимущества наличия гетероатома азота и системы полисопряжения в макромолекуле. Оказалось, что ПАНИ-покрытия эффективно связывают металл-содержащие соединения, такие как гем и хлорофиллы (которые являются мощными ингибиторами ПЦР). Поэтому при использовании ПАНИ-содержащих сорбентов для одностадийного выделения чистой концентрированной ДНК не требуется предварительного выделения гемоглобина или его фрагментов (при выделении ДНК из лизатов крови), а также хлорофиллов (при выделении ДНК из лизатов растительных тканей). На рис. 15 представлены результаты электрофореза в 1% агарозном геле образцов ДНК, полученных при пропускании лизатов цельной крови и лизатов листьев табака *Nicotiana Tabacum* L. через картриджи с ПАНИ-содержащим сорбентом. Было показано, что очищенные препараты ДНК практически не содержат гема или хлорофиллов (по отсутствию поглощения при характеристических длинах волн) и непосредственно пригодны для проведения ПЦР-анализа.

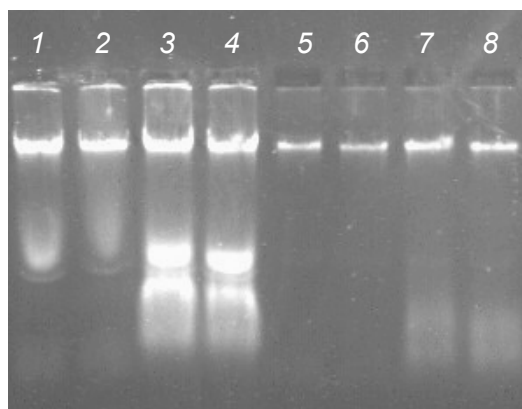


Рис. 15. Результаты электрофореза в 1% агарозном геле образцов ДНК, полученных при пропускании лизатов цельной крови коровы и листьев табака *Nicotiana Tabacum* L. через картриджи, упакованные ПАНИ-содержащим сорбентом: 1, 2 – исходный лизат крови; 3, 4 – исходный лизат листьев; 5, 6 – элюаты, содержащие ДНК из крови; 7, 8 – элюаты, содержащие растительную ДНК.

ПАНИ-содержащие сорбенты, полученные в результате матричной полимеризации анилина в присутствии иммобилизованных полисульфокислот, особенно эффективны при выделении ДНК из лизатов растительной ткани, содержащих значительное количество хлорофиллов. По-видимому, эффективное удерживание растительных пигментов происходит за счет присутствия остаточных сульфогрупп на поверхности сорбента. Предварительно сорбционные свойства ПАНИ-содержащих сорбентов, полученных в результате проведения полимеризации анилина на ПСК, иммобилизованной на поверхности силанированного носителя, а также в результате иммобилизации на поверхности силанированных носителей готовых комплексов *изо*-ПСК-ПАНИ, сравнивали со свойствами полученных ранее ПАНИ-содержащих сорбентов на основе немодифицированного кремнезема и кремнезема, модифицированного сульфированным сополимером стирола с дивинилбензолом (ПС-SO₃-ПАНИ) [43].

На рис. 16 представлены результаты выделения ДНК из смеси с РНК и белком (бычий сывороточный альбумин, БСА) с использованием ПАНИ-содержащих сорбентов, полученных как на основе полисульфостирола-покрытого кремнезема, так и сорбента, модифицированного *изо*-ПСК-ПАНИ. При этом выход ДНК при использовании обоих сорбентов оказался выше 80%, полоса РНК в обоих случаях отсутствует.

ДНК выходит в исключенном объеме, а РНК и белок сорбируются, причем степень сорбции белка на -NH₂-*изо*-ПСК-ПАНИ выше степени сорбции белка на -ПС-SO₃-ПАНИ (табл. 1). Таким образом, этот материал может быть использован для выделения ДНК из клеточных лизатов, представляющих собой сложные смеси биополимеров. Выход ДНК в исключенном объеме можно объяснить отсутствием взаимодействия анионных центров ДНК с азотсодержащими центрами в молекуле ПАНИ, а также наличием устойчивых водородных связей, стабилизирующих двунитевую структуру молекулы ДНК.

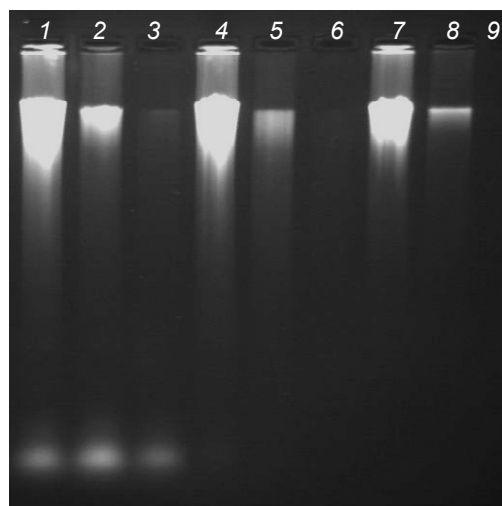


Рис. 16. Результаты электрофореза в 0.8% агарозном геле смеси, содержащей ДНК и РНК. 1–3 – исходная смесь (1 – без разведения, 2 – в разведении 1/2, 3 – в разведении 1/4); 4, 7 – элюаты, полученные после пропускания через картриджи исходной смеси; 5, 8 – элюаты, полученные после элюции картриджей Трис-НСl (рН 8.0); 6, 9 – элюаты, полученные после элюции картриджей водным раствором НСl (рН 3.0); 4–6 – элюаты, полученные при использовании МПС-ПС-SO₃-ПАНИ; 7–9 – элюаты, полученные при использовании МПС-NH₂-*изо*-ПСК-ПАНИ.

Рибонуклеиновая кислота, по-видимому, удерживается на поверхности сорбента благодаря гидрофобным взаимодействиям. Белковые молекулы удерживаются как на гидрофобных участках ПАНИ, так и на гидратированных атомах азота в амине при образовании водородных связей [57].

Таблица 1. Полученные сульфосодержащие сорбенты и их характеристики.

Сорбент	Содержание -SO ₃ H-групп в исходной ПСК, г-экв %	Удерживание белка*, мас. %
МПС-ПС-SO ₃ -ПАНИ	100	94.8
МПС-NH ₂ - <i>изо</i> -ПСК-ПАНИ	96	99.5
МПС-NH ₂ - <i>изо</i> -ПСК-ПАНИ (комплекс)	25	100
	60	100
	86	100

* На картриджи, содержащие по 100 мг сорбента, наносили по 100 мкл раствора БСА (3 мг/мл). Содержание белка в элюатах определяли по методу Бредфорда.

В отличие от сорбента, модифицированного *изо*-ПСК-ПАНИ, при использовании сорбента, полученного в присутствии *тере*-ПСК-ПАНИ, практически все нуклеиновые кислоты необратимо сорбируются. Таким образом, ПАНИ, который образуется на поверхности *тере*-ПСК, отличается по своим сорбционным свойствам от ПАНИ, образующегося на поверхности *изо*-ПСК,

а также на поверхности немодифицированного кремнезема. Вероятно, это обусловлено различиями в конформации макромолекул *изо*- и *тере*-ПСК. Таким образом *тере*-ПСК малоэффективен в качестве сомодификатора при получении ПАНИ-содержащего сорбента.

Анализ электрофореграмм образцов элюатов, отобранных после пропускания смеси, содержащей ДНК и БСА, через картриджи с сорбентами, полученными в результате модификации силанированного кремнезема готовыми комплексами *изо*-ПСК-ПАНИ с различным содержанием протонированных сульфогрупп, показал, что повышение содержания протонированных сульфогрупп в комплексе увеличивает выход ДНК. При этом удерживание белка на сорбентах составило не менее 99.5% (табл. 1). Таким образом, характер сорбции нуклеиновых кислот сорбентами, содержащими *изо*-ПСК, практически не отличается от полученных ранее ПАНИ-содержащих сорбентов, имеющих химически связанные с поверхностью сульфогруппы. Это позволяет предположить, что сорбенты, модифицированные комплексами *изо*-ПСК-ПАНИ, окажутся эффективными при выделении ДНК из лизатов растительной ткани, поскольку ранее было показано, что остаточные сульфогруппы, химически связанные с поверхностью ПАНИ-содер-

жащего сорбента, повышают его эффективность, в частности, удерживая хлорофиллы [43].

В случае *изо*-ПСК-ПАНИ присутствие дополнительных сорбционных центров (т. е. остаточных сульфогрупп) в полученных покрытиях обеспечивает дополнительные возможности для биоанализа, например, разделение одно- и двунитевых ДНК в зависимости от pH среды, как это показано на рис. 17. Для демонстрации этого эффекта использовали модельную смесь, содержащую двунитевую ДНК, выделенную из культуры агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* C58, а также одонитевую ДНК, полученную в результате обратной транскрипции РНК (с использованием транскриптазы РНКазы H^+), выделенной из вируса табачной мозаики, с последующим гидролизом РНК при $pH > 8.0$. Аликвоты таким образом приготовленной смеси наносили на картриджи, содержащие сорбент, модифицированный *изо*-ПСК-ПАНИ, полученные элюаты анализировали методом ПЦР (с использованием соответствующих специфических праймеров). Можно видеть, что повышение значения pH от 8 до 9 приводит к увеличению выхода как одонитевой, так и двунитевой ДНК в полученных элюатах. В то же время, отношение значений концентрации одонитевой и двунитевой ДНК (равное $\sim 1:3$) остается постоянным.

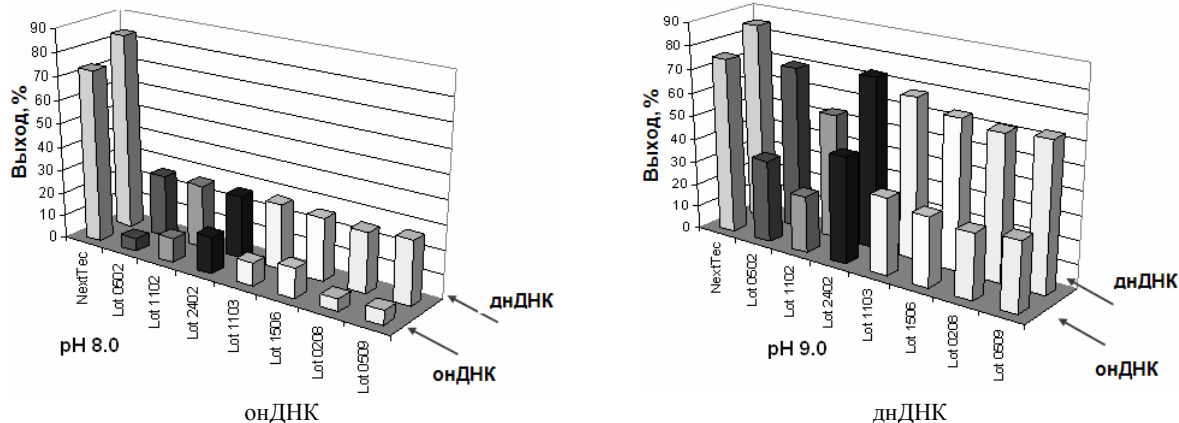


Рис. 17. Разделение одонитевой (онДНК) и двунитевой ДНК (днДНК) в зависимости от pH среды (элюента) с использованием *изо*-ПСК-ПАНИ-модифицированного сорбента.

Таким образом, сорбенты, полученные при полимеризации анилина на поверхности кремнезема с предварительно иммобилизованной ПСК, и сорбенты, полученные при иммобилизации готовых комплексов *изо*-ПСК-ПАНИ, селективны к парам нуклеиновая кислота–белок и ДНК–РНК. При этом эффективность использования полученных материалов для выделения ДНК зависит от природы матричного полимера и повышается с увеличением содержания протонированных сульфогрупп. В целом, использование интрамолекулярных комплексов *изо*-ПСК-ПАНИ в качестве модификаторов при получении композиционных сорбентов на основе кремнезема упрощает процедуру получения таких материалов, а также облегчает масштабирование данной технологии, в первую очередь, благодаря стабильности заранее подготовленного модификатора при хранении.

В свою очередь, технология получения компо-

зиционных фторполимерсодержащих сорбентов, использующая в качестве носителя обработанный озоном кремнезем, дает дополнительные преимущества при разделении биополимеров, прежде всего, при разделении нуклеиновых кислот, различающихся вторичной структурой. Так, полученные сорбенты, модифицированные фторополимерами ТФЭ с аллиламином и аллиловым спиртом, использовали для одностадийного разделения и очистки двунитевой ДНК и РНК из бактериальных лизатов *Agrobacterium tumefaciens* C58 (рис. 18) и модельных смесей, содержащих одонитевую ДНК (синтетический олигонуклеотид) (рис. 19) и фрагментированную двунитевую ДНК (рис. 20). При этом бактериальная РНК или короткие одонитевые синтетические олигонуклеотиды удерживались сорбентом в различной степени, в зависимости от химической структуры полимера, иммобилизованного на поверхности носителя.

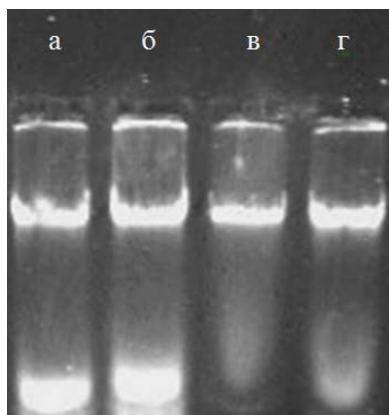


Рис. 18. Электрофорез в 0.8% агарозном геле образцов ДНК, выделенных из лизатов агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* C58 с использованием ПТФЭ-содержащих сорбентов: а – исходный лизат; б–г – элюаты, полученные после прохождения лизата через картриджи, содержащие Si-500-ПТФЭ-ГФП (б), Si-500-ПТФЭ-аллиламин (в), Si-500-ПТФЭ-аллиловый спирт (г).

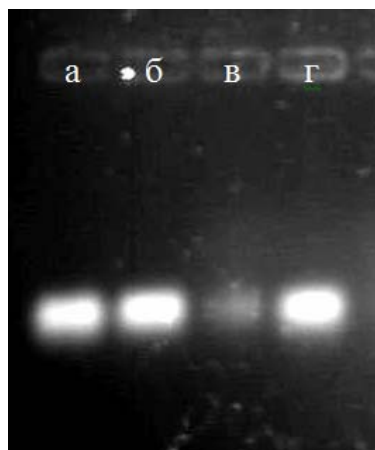


Рис. 19. Удерживание олигонуклеотидов (ADA-праймер, Proligo GmbH, Германия) ПТФЭ-содержащими сорбентами, полученными на основе кремнезема, обработанного озоном (результаты электрофореза в 0.8% агарозном геле): а – раствор олигонуклеотида перед нанесением на картридж; б–г – элюаты, полученные после использования сорбентов: Si-500-ПТФЭ-ГФП (б), Si-500-ПТФЭ-аллиламин (в) и Si-500-ПТФЭ-аллиловый спирт (г).

Было показано, что при использовании ПТФЭ-содержащих сорбентов выход нуклеиновых кислот изменяется в зависимости от заряда поверхности сорбента. Удерживание одонитовой ДНК и РНК возрастает в ряду ПТФЭ-ГФП – ПТФЭ-аллиловый спирт – ПТФЭ-аллиламин (с поверхностной концентрацией аминогрупп около 25 мкмоль/г_{сорбента}). В то же время, выход двунитевой ДНК повышается при использовании сорбента, содержащего гидроксильные группы, по сравнению с материалом, модифицированным сополимером, содержащим звенья аллиламина. Выход двунитевой ДНК оценивали, используя раствор 1 кб ДНК-маркера (Gene Ruler™, Fermentas, США) в качестве модельной смеси, содержащей фраг-

менты ДНК различной длины. Из рис. 20 видно, что материал, модифицированный ПТФЭ-аллиламином с высокой концентрацией аминогрупп (около 280 мкмоль/г_{сорбента}), эффективно удерживает даже относительно высокомолекулярные двунитевые фрагменты ДНК. В то же время, удерживание таких фрагментов сорбентами, модифицированными ПТФЭ-ГФП, как и ожидалось, было незначительным как в случае материалов, полученных с использованием озон-индуцированной технологии, так и в случае использования радиационной технологии.

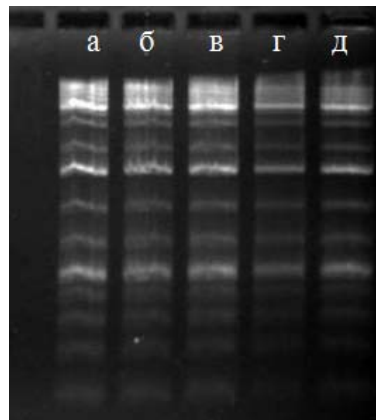


Рис. 20. Удерживание фрагментов двунитевой ДНК ПТФЭ-содержащими сорбентами (результаты электрофореза в 0.8% агарозном геле): а – смесь фрагментов ДНК (Gene Ruler™, Fermentas, США) перед нанесением на картридж; б–д – элюаты, собранные в результате использования различных сорбентов: МПС-ПТФЭ, полученного по радиационной технологии (б); сорбентов, полученных на основе кремнезема, обработанного озоном: МПС-ПТФЭ-ГФП (в), МПС-ПТФЭ-аллиламин (с концентрацией поверхностных аминогрупп 280 мкмоль/г_{сорбента}) (г) и МПС-ПТФЭ-аллиловый спирт (д).

Для оценки степени очистки ДНК, выделенной при пропускании через слой сорбента лизата бактериальной культуры *A. tumefaciens* C58, отобранные элюаты тестировали методом ПЦР в реальном времени (РВ-ПЦР). Выход ДНК, выделенной с использованием сорбента, модифицированного ПТФЭ-ГФП (полученного с применением радиационной технологии), принимали за 100%. Полученные результаты представлены в табл. 2. Для сравнения эффективности амплификации ПЦР-фрагментов использовали метод определения точки пересечения (C_p) максимума второй производной кривой амплификации с базовой линией [58]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что выход очищенной ДНК в собранных элюатах при использовании ПТФЭ-ГФП-содержащего сорбента в среднем вдвое превышает выход ДНК при использовании материалов, модифицированных сополимерами ТФЭ с аллиламином и аллиловым спиртом. Однако все три модификации ПТФЭ-содержащего сорбента обеспечивают выход очищенной ДНК, непосредственно пригодной для проведения ПЦР-анализа.

Таблица 2. Выход ПЦР-фрагментов бактериальной ДНК, выделенной с помощью ПТФЭ-содержащих сорбентов.

Материал	Флуоресцентная проба (Fam)		Концентрация ПЦР-продукта	
	C _p	Станд. откл., %	Концентрация, %	Станд. откл., %
МПС-ПТФЭ-ГФП (радиационная технология)	19.5	0.1	100	0.8
МПС-ПТФЭ-ГФП (озонированный носитель)	19.5	0.5	100	0.9
МПС-ПТФЭ-аллиламин (озонированный носитель)	20.6	0.4	71.2	2.3
МПС-ПТФЭ-аллиловый спирт (озонированный носитель)	20.3	0.4	87.5	2.9

Таким образом, разработанная технология получения композиционных сорбентов на основе кремнезема, обработанного озоном, пригодна для создания материалов, обеспечивающих эффективную одностадийную очистку двунитевых ДНК. Получаемые при этом ДНК-содержащие элюаты могут непосредственно использоваться в ПЦР-анализе. Разработанная технология дает возможность получать сорбенты с различным зарядом поверхности и различной степенью гидрофильности, которые можно применять, например, для разделения нуклеиновых кислот, имеющих различную вторичную структуру.

С медицинской точки зрения наибольший интерес представляет применение ПАНИ-содержащих материалов, полученных с помощью «озоновой» технологии, в клинической диагностике патогенов человека. Такие возможности, в частности, были продемонстрированы на примерах выделения ДНК человека (iC-ген) и вирусной ДНК (ДНК фага Т4) с последующей ПЦР-диагностикой из таких «трудных» образцов, как кровь или модельные смеси, содержащие кровь с добавлением частиц фага Т4 (добавление вирусных частиц осуществлялось перед проведением лизиса) [28, 59]. При проведении указанных тестов использовали различные протоколы лизиса образцов. Наиболее эффективным оказался протокол, включающий стадию термического лизиса образцов, содержащих кровь. Эффективность протоколов выделения ДНК с использованием разработанного ПАНИ-содержащего сорбента сравнивали со стандартной процедурой пробоподготовки с использованием коммерческого набора «Проба-ГС» (ЗАО «ДНК-Технология», Россия) и протоколом выделения ДНК с использованием мини-колонок NextТес GmbH (Германия). Очищенную таким образом ДНК использовали в ПЦР. Концентрацию амплифицированных ПЦР-фрагментов в этих тестах сравнивали с концентрацией ПЦР-фрагмента, полученного при выделении ДНК с помощью набора «Проба-ГС». Средние значения C_p и относительные концентрации ДНК в образцах, определенные в результате проведения ПЦР, представлены на рис. 21 (в случае амплификации человеческого гена iC) и рис. 22 (в случае амплификации вирусной ДНК). Полученные данные подтверждают, что при использовании ПАНИ-содержащего сорбента в сочетании с разработанным протоколом лизиса значительно уменьшаются средние значения C_p при

ПЦР-детекции как человеческой, так и вирусной ДНК в образцах крови. В частности, предложенный подход обеспечивает 8-кратное увеличение выхода человеческого iC-гена и 10-кратное увеличение выхода вирусной ДНК по сравнению с методом «Проба-ГС».

Основываясь на данных, полученных с использованием модельных ДНК-содержащих смесей, можно с высокой степенью уверенности ожидать, что разработанный сорбент значительно повысит эффективность пробоподготовки ДНК-содержащих образцов в клинической ПЦР-диагностике. Предварительные эксперименты проводили, сравнивая протокол одностадийного выделения ДНК с помощью разработанного ПАНИ-содержащего сорбента (протокол I) и стандартный набор Диадом™ ДНК Преп 100 (ЗАО «ИзоГен», Россия) (протокол II). Протокол II включает эффективный ферментативный лизис образца, однако является относительно более трудоемким и продолжительным по сравнению с протоколом I. Исследовали клинические образцы урогенитальных мазков, взятые у десяти случайным образом отобранных пациентов и обработанные в соответствии с протоколами I и II. Проводили одновременное определение методом ПЦР двух групп микроорганизмов, включающих *Gardnerella vaginalis* и *Candida albicans*, а также *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis* и *Mycoplasma genitalium*, соответственно. Полученные результаты представлены на рис. 23 и 24. Несмотря на то, что выход ПЦР-фрагментов после использования протокола I несколько ниже по сравнению с результатом использования протокола II, результаты ПЦР-диагностики в обоих случаях идентичны. Более того, чистота ДНК, выделенной в соответствии с протоколом I, выше, чем в случае использования протокола II, что подтверждается, в частности, более эффективной амплификацией внутреннего стандарта. Несколько более низкий выход ДНК, наблюдаемый на электрофореграмме в первом случае, объясняется тем фактом, что при проведении пробоподготовки по протоколу I исходный образец разбавляется лизирующим буфером примерно в 6 раз больше по сравнению с процедурой, осуществляемой в соответствии с протоколом II. При необходимости степень разбавления образца может быть легко снижена за счет использования более концентрированных лизирующих растворов.

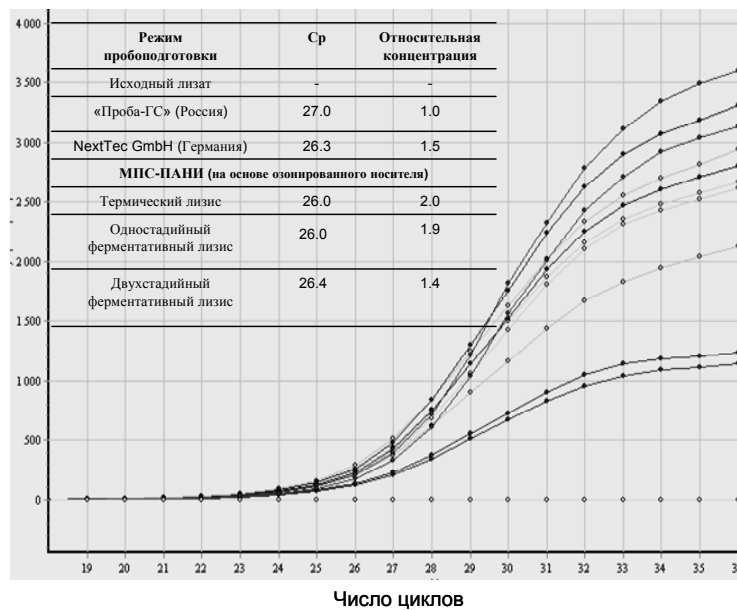


Рис. 21. Амплификация ДНК человека в ПЦР (iC-ген). ДНК выделяли различными способами (детали указаны в таблице на рисунке); стрелки указывают на кривые амплификации образцов, полученных с помощью ПАНИ-содержащего сорбента после термического лизиса.

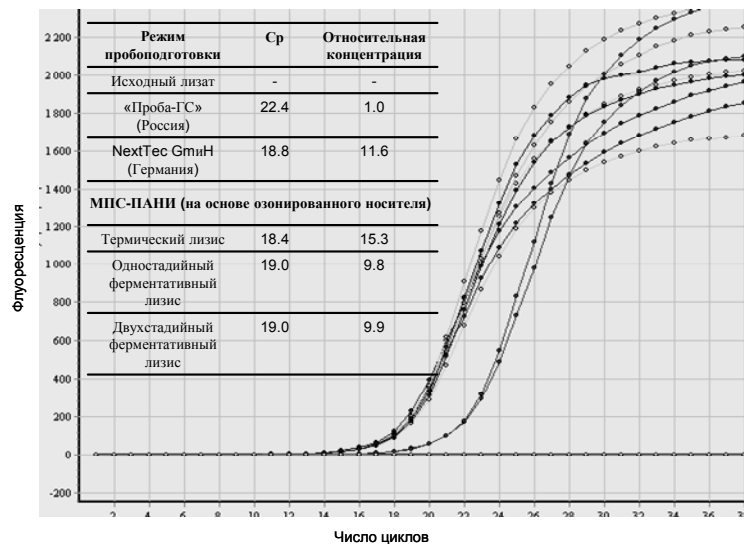


Рис. 22. Амплификация вирусной ДНК в ПЦР (фаг Т4). ДНК выделяли различными способами (детали указаны в таблице на рисунке); стрелки указывают на кривые амплификации образцов, полученных с помощью ПАНИ-содержащего сорбента после термического лизиса.

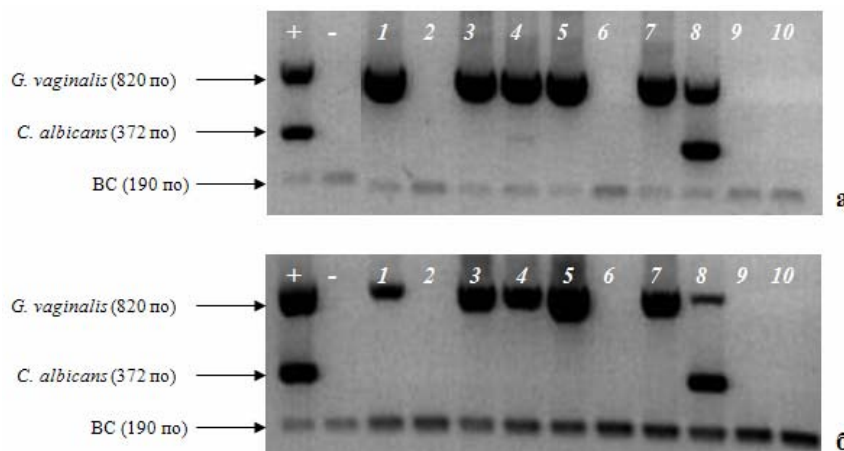


Рис. 23. ПЦР-детекция *Gardnerella vaginalis* и *Candida albicans* в образцах урогенитальных мазков. Результаты электрофореза в 2% агарозном геле. Выделение ДНК проводили с использованием стандартного набора Диатом™ДНК Преп 100 («ИзоГен», Россия) (ряд а) и картриджей, упакованных ПАНИ-содержащим сорбентом, полученным на основе носителя, обработанного озоном (ряд б). Стрелки указывают положение ПЦР-фрагментов, относящихся к *G. vaginalis* (820 п.о.), *C. albicans* (372 п.о.) и внутреннему стандарту (190 п.о.) [п.о. – пара оснований].

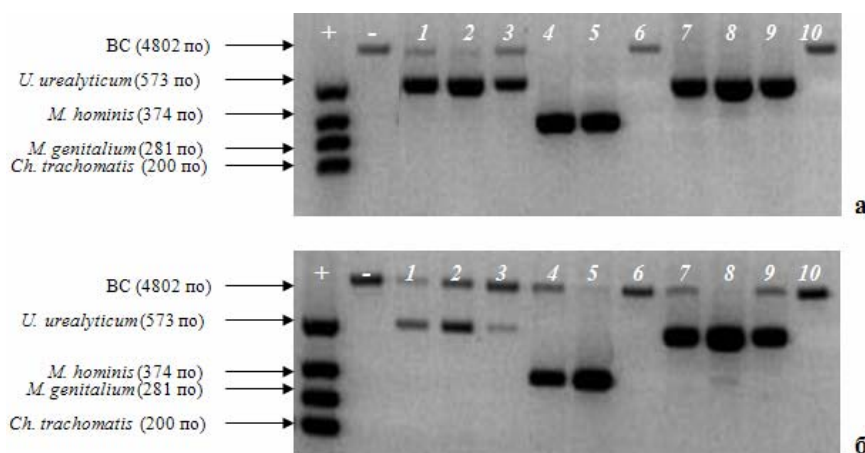


Рис. 24. ПЦР-детекция *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, и *Mycoplasma genitalium* в образцах урогенитальных мазков (использовали те же пробы, которые исследовали на наличие возбудителей в тесте, представленном на рис. 23). Результаты электрофореза в 2% агарозном геле. Выделение ДНК проводили с использованием стандартного набора ДИАТОМ™ ДНК Преп 100 («ИзоГен», Россия) (ряд а) и картриджей, упакованных ПАНИ-содержащим сорбентом, полученным на основе носителя, обработанного озоном (ряд б). Стрелки указывают положение ПЦР-фрагментов, относящихся к внутреннему стандарту (4802 п.о.), *U. urealyticum* (573 п.о.), *M. hominis* (374 п.о.), *M. genitalium* (281 п.о.) и *Ch. trachomatis* (200 п.о.).

В большинстве случаев использование картриджей, упакованных ПАНИ-содержащим сорбентом, позволяет значительно экономить время при проведении процедуры выделения ДНК. Например, пробоподготовка, основанная на использовании стандартного метода «Проба-ГС», включает около 20 манипуляций. В то же время, процедура пробоподготовки в соответствии с разработанным протоколом I состоит из 8 простых манипуляций. Как правило, сам процесс биосепарации (т.е. непосредственное взаимодействие лизированного образца с поверхностью сорбента) занимает всего 0.5–3 мин, но не более 5 мин.

Таким образом, использование картриджей, содержащих сорбенты, модифицированные ПАНИ, обеспечивает эффективное одностадийное выделение и очистку ДНК человека из образцов крови, кроме того, такие материалы могут с успехом применяться в эффективной и быстрой пробоподготовке для клинической ПЦР-диагностики, по крайней мере, некоторых патогенов человека.

2.2. Применение ПАНИ-покрытий в биоаналитических целях

Выше были рассмотрены примеры применения пористых неорганических матриц, модифицированных нанослоями полимеров в качестве сорбентов для выделения и очистки биополимеров. Весьма распространенными биоматериалами являются также плоские матрицы, которые являются типичными «рабочими телами» биосенсоров, биочипов и ряда других биоаналитических и диагностических устройств. Характеристики подобных систем обычно получают, исследуя поверхности различными физическими и химическими методами, такими как плазмонный резонанс [60], пьезоэлектрический эффект [61], SELDI-TOF-масс-спектрометрия [62] и др. Весьма перспективным для исследования процессов сорбции и молекулярного узнавания на плоских матрицах в режиме реального времени оказался недавно разработанный спектральный корреляционный

метод, основанный на сопоставлении сигналов от двух интерферометров, встроенных в оригинальную оптическую схему [63]. В качестве «рабочего тела» в данном методе используется плоская стеклянная пластинка толщиной 90–120 мкм. Сорбция каких-либо молекул на внешней поверхности пластины сопровождается изменением интерференционной картины и дает информацию об изменении толщины поверхностного адсорбционного слоя в режиме реального времени. Этот метод использовали для исследования сорбции белков на ПАНИ, для чего поверхность стеклянной пластинки была модифицирована нанослоем этого полимера. На рис. 25 приведены результаты исследования сорбции ряда биополимеров на такой пластинке. Видно, что сорбция протекает достаточно быстро, а эффективная толщина адсорбционных слоев белков (Δh) может достигать 4 нм. В полном соответствии с рассмотренными выше данными, полученными хроматографическими методами с использованием пористых сорбентов, модифицированных ПАНИ, ДНК из тимуса телят и высокомолекулярный синтетический полинуклеотид (калийная соль полиуридилевой кислоты) практически не сорбируются, в то время как белки связываются с поверхностью ПАНИ. Величина сорбции зависит от природы белка, прежде всего от значения pI белка, хотя прямой связи с молекулярным весом сорбата проследить не удалось. Так, цитохром *c* обратимо адсорбируется на поверхности при pH 7.2, а десорбируется при pH 2.0. Кроме того, было показано, что цитохром *c* (молекулярная масса 12 000), казеин (М.м. 20000), миоглобин (М.м. 17 800), иммуноглобулин G (М.м. 125 000) и поли-L-лизин (М.м. 150000) могут связываться с поверхностью покрытой ПАНИ кремниевой пластины (чипа) при pH 7.2 (причем связывание нуклеиновых кислот при этом не наблюдается).

Таким образом, данные, полученные с помощью спектрального корреляционного метода с использованием плоских матриц, модифициро-

ванных нанослоями полимеров, позволяют объяснять и предсказывать свойства сорбентов для жидкостной хроматографии биополимеров. С другой стороны, их можно рассматривать в качестве научной основы для создания биосенсоров и других биоаналитических устройств.

Как было показано выше, введение дополнительной функциональности в макромолекулы фторполимеров расширяет области их применения. Сходным образом, введение дополни-

тельных функциональных групп в ПАНИ-покрытия открывает новые возможности для их использования в биоанализе. Примером удачного использования покрытий на основе сополимеров анилина с *m*-аминобензойной кислотой (*m*-АБК) в биоаналитических целях может служить разработка покрытий соответствующего сополимера на кремниевых пластинах (чипах) для непосредственного применения в качестве рабочих поверхностей в масс-спектрометрии.

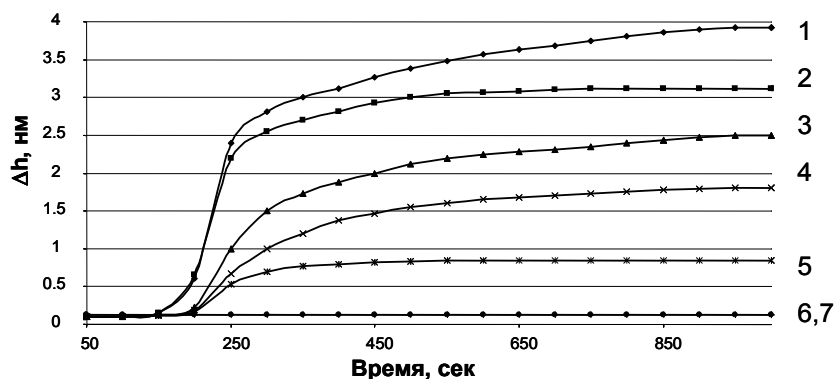


Рис. 25. Динамика сорбции различных биополимеров на поверхности стеклянных слайдов, модифицированных нанослоями ПАНИ: 1 – цитохром *c*; 2 – казеин; 3 – миоглобин; 4 – IgG; 5 – поли-*L*-лизин; 6 – ДНК из тимуса теленка; 7 – калиевая соль полиуридиновой кислоты. Использовали 0.01% растворы биополимеров в 0.1 М фосфатно-солевом буфере (рН 7.2). Скорость подачи раствора 2 мкл/мин.

С целью 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 люминесцентными (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-*m*-АБК

поверхность кремниевого чипа и выдерживали 5 мин при комнатной температуре. Избыток жидкости удаляли, промывая пластинку буферным раствором, сорбцию визуализировали в УФ-свете. Полученные результаты представлены в табл. 3. Таким образом, разделение белков в зависимости от значений их *pI* можно проводить непосредственно на кремниевых пластинах, модифицированных анилин-содержащим сополимером, используя трис-НСl буфер или другой подходящий раствор.

Таблица 3. Соответствие между цветом пробы и индивидуальным белком, а также результаты удерживания белков с различным значением *pI* на кремниевом чипе, модифицированном сополимером анилина с *m*-АБК.

Белок	<i>pI</i>	Цвет	До отмывки	pH		
				3.0	6.0	9.0
Цитохром <i>c</i>	10.3	Зеленый	+	+	+	+
Миоглобин	6.9	Красный	+	–	+/-	–
Пепсин	2.8	Желтый	+	–	–	–

Примечание: (+) относится к случаям эффективной сорбции белка на поверхности пластинки (чипа), определяемой при УФ-облучении; (+/-) соответствует неполной сорбции белка; (–) означает, что сорбция белка отсутствует.

В качестве примера эффективного применения покрытия на основе сополимеров анилина с замещенными анилинами можно привести патент [64]. Это изобретение используется при реализации так называемой «масс-спектрометрии с ионизацией при лазерной десорбции», при которой в качестве среды, абсорбирующей энергию УФ-источника, используют полимерные покрытия. В то же время эти покрытия являются подложкой для нанесения анализируемой пробы (например, смеси пептидов и/или белков). Соответствующие полимерные покрытия высаживали на поверхности кремниевых чипов в результате сополиме-

ризации анилина с *m*-АБК.

Масс-спектрометрия широко используется в качестве аналитического метода для определения молекулярной массы и структуры различных соединений. Метод включает перевод молекул образца в газовую фазу и последующую ионизацию молекул. Молекулярные ионы разделяются в электрическом или магнитном полях в высоком вакууме в соответствии с величинами их отношений массы к заряду. В последние десятилетия масс-спектрометрия доказала свою исключительную эффективность как воспроизводимый и чувствительный метод анализа биополимеров,

таких как белки и пептиды. С появлением технологий, использующих «мягкую» ионизацию, таких как «электронная ионизация распылением», «лазерная десорбция-ионизация в присутствии матрицы» (MALDI) или «ионизация лазерной десорбцией, усиленная поверхностью» (SELDI), стало возможным переводить в газовую фазу и ионизировать нелетучие, крупные и термически неустойчивые молекулы без значительного повреждения их структуры.

Однако, указанные технологии требуют использования так называемых «матриц», т.е. веществ, поглощающих энергию (как правило, в качестве таких абсорберов используют ароматические кислоты, такие как α -циано-4-гидроксикоричная кислота), смешанные с анализируемой пробой. Матрицы не только способны переводить аналит в газовую фазу, но также являются причиной появления значительного фонового сигнала в низкомолекулярной части масс-спектра. Поэтому существует потребность в разработке такого процесса, при котором фоновый сигнал уменьшился бы настолько, чтобы не мешать интерпретации спектра, а добавление вещества-матрицы не требуется.

Основная идея изобретения, изложенного в патенте [64], состоит в замене «вещества-матрицы» полимерным материалом, распределенным по поверхности кремниевого чипа. Было найдено, что поставленная цель может быть достигнута при использовании полимера, имеющего в составе ароматические звенья, способные поглощать УФ-излучение, например, ПАНИ или его производных. При этом полимер поглощает УФ-излучение, и адсорбированная энергия затем пере-

дается на молекулы образца, предварительно нанесенные на эту же полимерную поверхность. Во время этапа облучения лазером полимерная поверхность может нагреваться. Однако, полимерные покрытия, предложенные в обсуждаемом патенте, демонстрируют высокую термическую и окислительную стабильность даже в условиях облучения.

Кремниевые чипы, покрытые сополимером ПАНИ-*m*-АБК, анализировали с добавлением матрицы и в отсутствие матрицы (поглотителя энергии) с целью сравнения эффективности стандартной и усовершенствованной процедур пробоподготовки при анализе соединений в низкомолекулярной области спектра. В экспериментах использовали два наиболее распространенных типа матриц: α -циано-4-гидроксикоричную кислоту и горчичную кислоту (Bio-Rad, США). Результаты подтвердили, что в случае отсутствия матрицы фоновые пики в спектре не наблюдались. В случае добавления матрицы в системе накапливались ионы, обуславливающие появление интенсивного фона, маскирующего пики низкомолекулярных аналитов. На рис. 26 приведены масс-спектры пептидного стандарта, полученные при использовании кремниевого чипа, модифицированного сополимером анилина с *m*-АБК (при молярном соотношении анилин:*m*-АБК, равном 3:1). Эти результаты подтверждают, что использованное полимерное покрытие обладает высокой «матричной» активностью и обеспечивает эффективное образование протонированных молекулярных ионов $[M + H]^+$. Фонových пиков на масс-спектре при этом не наблюдается.

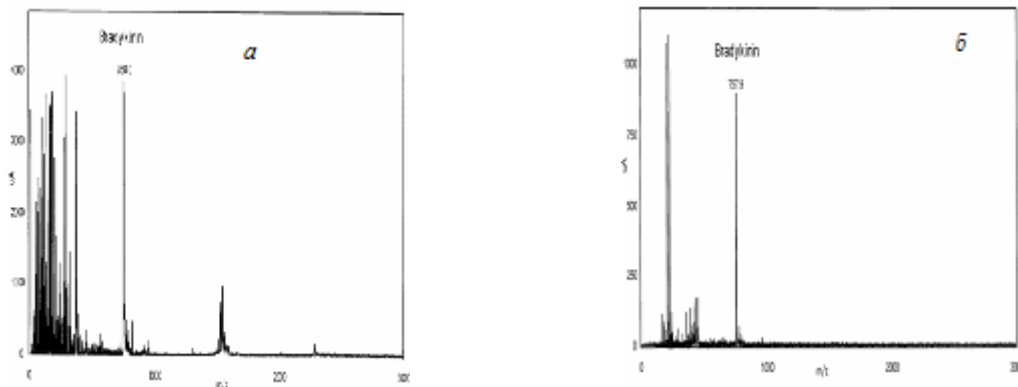


Рис. 26. Масс-спектры пептидного стандарта, полученные при использовании кремниевого чипа, модифицированного сополимером анилина с *m*-АБК, при добавлении (а) и в отсутствие (б) матрицы (α -циано-4-гидроксикоричной кислоты).

Таким образом, разработана новая эффективная аналитическая система на основе способности ПАНИ-покрытий разделять белки (пептиды) и накапливать энергию УФ-излучения.

Заключение

Весь спектр представленных выше методик получения композиционных полимер-модифицированных материалов основан на использовании двух типов модификаторов, а именно фторполимеров и полианилинов. Композиционные сорбенты, полученные на основе объемно-пористых и

плоских матриц, модифицированных фторполимерами и полианилинами, весьма эффективны при использовании в биосепарации и диагностике, прежде всего для выделения очищенных нуклеиновых кислот из различных источников, разделения белков и пептидов, а также для решения биоаналитических задач. Функциональные свойства рассмотренных материалов делают их перспективными для использования в автоматизированных биосепарационных системах как в области геномики, так и в области протеомики. Однако

этим области применения указанных материалов не ограничиваются. Как мы показали на примере сополимеров анилина с замещенными анилинами, введение дополнительной функциональности в такие полимерные модификаторы позволяет получать новые эффективные биосовместимые материалы, например, носители для биоаналитического применения. Придание дополнительной функциональности фторполимерам также расширяет области их применения. Использование частично фторированных полимеров для модифицирования носителей позволяет не только улучшать их смачиваемость, что повышает эффективную емкость таких материалов, но также дает возможность иммобилизации различных биолитандов. Для этого необходимо присутствие на поверхности материала доступных специфических функциональных групп. Прямой синтез фторполимеров с требуемыми группами является непростой задачей. Поэтому более простой способ получения функционализированных фторсодержащих матриц заключается в формировании тонкого нерастворимого фторполимерного покрытия на поверхности носителя в результате «кастинга» готового полимера из его раствора в подходящем растворителе.

Таким образом, несмотря на очевидные различия в химической структуре фторполимеров и

полианилинов, а также в механизмах полимеризации, в соответствии с которыми получают эти полимеры, сходство их сорбционных свойств позволяет совместно рассматривать фторполимеры и ПАНИ-содержащие нанокомпозиты в качестве объекта исследований в области биомедицинского материаловедения. Указанным материалам присущ комплекс свойств, выделяющий их среди всего многообразия синтетических сорбентов. Прежде всего, их отличает способность образовывать сплошные стабильные и нерастворимые нанопокрyтия на поверхности твердых матриц. Процесс формирования покрытия при этом может быть эффективно локализован в поверхностных слоях носителя. Однако, главное преимущество фторполимер- и ПАНИ-содержащих нанокомпозитов перед традиционными сорбционными материалами заключается в их способности разделять нуклеиновые кислоты и белки в одну стадию. Биосовместимость, высокая селективность при разделении смесей различных классов биополимеров и возможность дополнительной химической модификации позволяют не только разрабатывать менее трудоемкие и более эффективные протоколы для практического применения данных материалов в биосепарации и диагностике, но также расширять области их применения.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Маккреди Б.Дж., Чимера Д.А. Обнаружение и идентификация патогенных микроорганизмов молекулярными методами / Молекулярная клиническая диагностика. Методы. – М.: Мир, 1999. С. 496–506.
2. Ridly A.M. Genomic fingerprinting by application of rep-PCR / Molecular bacteriology. Protocols and Clinical Applications. – Totowa: Humana Press, 1998. P. 103–117.
3. Лопухов Л.В., Эйдельштейн М.В. Полимеразная цепная реакция в клинической микро-биологической диагностике // Клинич. микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т. 2. № 3. С. 96–106.
4. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on // Nature Prot. 2006. V. 1. № 2. P. 581–585.
5. Marko M.A., Chipperfield R., Bimboim H.C. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder // Anal. Biochem. 1982. V. 121. P. 382–387.
6. Lehmann U., Vandevyver C., Parashar V.K., Gijs M.A. Droplet-based DNA purification in a magnetic lab-on-a-chip // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2006. V. 45. P. 3062–3067.
7. Safarik I, Safarikova M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides // BioMagn. Res. Technol. 2004. V. 2. № 7. P. 1–17.
8. 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. № 3. P. 495–503.
9. Cady N.C. Nucleic acid purification using microfabricated silicon structures // Biosensors & Bioelectronics. 2003. V. 19. P. 59–66.
10. Tian H., Hühmer A.F.R., Landers J.P. Evaluation of silica resins for direct and efficient extration of DNA from complex biological matrices in a miniaturized format // Anal. Biochem. 2000. V. 283. P. 175–191.
11. Perez-Ramirez B., Steckert J.J. Therapeutic proteins: Methods and protocols // Series: Methods in molecular biology. 2005. V. 308. P. 301–318.
12. Carr S.M., Griffiths O.M. Preparative density-gradient ultracentrifugation of DNA // Biochem Genet. 1987. V. 25. P. 385–390.
13. Zeugin J.A., Hartley J.L. Ethanol precipitation of DNA // Focus. 1985. V. 7. № 4. P. 1–2.
14. Crouse J., Amorese D. Ethanol precipitation: Ammonium acetate as an alternative to sodium acetate // Focus. 1987. V. 9. № 2. P. 3–5.
15. Paithankar K.R., Prasad K.S. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. P. 1346–1352.
16. Janson J.-C., Ryden L. Protein purification. Principles, high resolution methods and applications. 2nd ed. – NY: J. Wiley & Sons Inc., 1998. 695 p.
17. Albertson P.-A. Partion of cell and macromolecules. Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes and cell in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology. 3rd Ed. – NY: J. Wiley & Sons, 1986. 346 p.

18. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. – М.: Наука, 1985. 536 с.
19. Ivanov A.E., Saburov V.V., Zubov V.V. Polymer-coated adsorbents for separation of biopolymers // *Adv. Polym. Sci.* 1992. V. 104. P. 135–175.
20. Капустин Д.В., Сабуров В.В., Завада Л.Л., Евстратов А.В., Барсамян Г.Б., Zubov V.P. Композиционные фторполимерсодержащие сорбенты для выделения и очистки биополимеров // *Биоорган. химия*. 1998. Т. 24. № 11. С. 868–876.
21. Капустин Д.В. Синтез композиционных сорбентов на основе фторированных полибутадиенов для выделения нуклеиновых кислот: дис. ...канд. хим. наук. – М., 2000. 134 с.
22. Ivanov A.E., Belov S.V., Zubov V.P. Structure of the bonded polymeric phases and features of protein separations on composite anion-exchangers // *Polym. Sci. A*. 1994. V. 36. № 2. P. 276–280.
23. Vikhrov A.A., Gorokhova I.V., Generalova A.N., Kalyazina O.V., Murzabekova T.G., Zubov V.P. Multi-component thermosensitive systems for biocatalysts // *Rus. Chem. Bull.* 2005. V. 54. № 2. P. 452–457.
24. Saburov V.V., Muydinov M.R., Zubov V.P., Kapustin D.V. Novel composite fluoropolymer-containing adsorbents. Structure and chromatographic properties // *Abstr. of the Third Int. Symp. on Bioorganic Chemistry*. – Dagomys, Russia, 1995. P. 107.
25. Муйдинов М.Р. Синтез и исследование композиционных материалов, модифицированных поверхностно привитым политетрафторэтиленом: дис. ...д-ра хим. наук. М., 2006. 376 с.
26. Давранов А.А., Кирюхин Д.П., Муйдинов М.Р., Баркалов И.М. Полимеризация тетрафторэтилена на поверхности радиолизованного каолина // *Высокомолек. соед. Б*. 1988. Т. 30. № 10. С. 727–730.
27. Zubov V.P., Kapustin D.V., Generalova A.N., Yagudaeva E. Yu., Sizova S.V., Vikhrov A.A., Muydinov M.R. Modification of solids with polymer nanolayers as a process for manufacture of novel biomaterials // *Polym. Sci. A*. 2007. V. 49. № 12. P. 1247–1264.
28. 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. № 2. P. 241–255.
29. Володина В.И., Тарасов А.И., Спасский С.С. Полимеризация аллиловых мономеров // *Успехи химии*. Т. 39. № 2. С. 276–303.
30. Saburov V.V., Muidinov M.R., Guryanov S.A., Kataev A.D., Turkin S.I., Zubov V.P. Perfluoropolymer-containing silicon sorbents and their application in reverse-phase chromatography of biologically-active substance // *Rus. J. Phys. Chem. A*. 1991. V. 65. № 10. P. 2692–2698.
31. Saburov V.V., Zubov V.P., Turkin S.I., Kisilev E.M., Dmitriev K.N., Tsarkova M.S. Methods of preparing modified macroporous silica for chromatography of biopolymers. Patent RU № 2080905. 1998.
32. Libert J., Bredas J.L. Self-trapping of positive polarons upon evolution from leucoemeraldine to pernigraniline: a theoretical study // *Synth. Met.* 1995. V. 69. № 1. P. 121–122.
33. Musfeldt J. L., Reynolds J. R., Tanner D. B., Ruiz J. P., Wang J., Pomerantz M. Luminescent polymers with discrete emitter units // *J. Polym. Sci., Polym. Phys. Ed.* 1994. V. 32. P. 2395–2404.
34. Anderson M.R., Mattes B.R., Reiss H., Kaner R.B. Conjugated polymer films for gas separations // *Science*. 1991. V. 252. P. 1412–1415.
35. Lu W.-K., Elsenbaumer R.L., Wessling B. Corrosion protection of mild steel by coatings containing polyaniline // *Synth. Met.* 1995. V. 71. № 1-3. P. 2163–2166.
36. Karyakin A.A., Maltsev I.A., Lukachova L.V. The influence of defects in polyaniline structure on its electroactivity: optimization of "self-doped" polyaniline synthesis. // *J. Electroanal. Chem.* 1996. V. 402. № 1-2. P. 217–219.
37. Kapustin D.V., Yagudaeva E.Y., Zavada L.L., Zhigis L.S., Zubov V.P., Yaroshevskaya E.M., Plobner L., Leiser R.-M., Brem G. A composite polyaniline-containing silica sorbent for DNA isolation // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2003. V. 29. № 3. P. 281–285.
38. Sapurina I., Stejskal J. The mechanism of the oxidative polymerization of aniline and formation of supramolecular polianilin structures // *Polym. Int.* 2008. V. 57. P. 129–1325.
39. Duić L., Mandić Z., Kovač S. Polymer-dimer distribution in the electrochemical synthesis of polyaniline // *Electrochim. Acta*. 1995. V. 40. № 11. P. 1681–1688.
40. Wu S., Zeng F., Shen J. Diffusion-controlled deposition of polyaniline onto poly (methylmethacrylate) substrates // *Polym. Int.* 1998. V. 47. P. 335–339.
41. Ягудаева Е.Ю. Синтез полианилинсодержащих сорбентов для выделения и очистки нуклеиновых кислот и белков: дис. ...канд. хим. наук. – М., 2003. 85 с.
42. Орлов А.В., Киселева С.Г., Юрченко О.Ю., Карпачева Г.П. Особенности окислительной полимеризации анилина в присутствии дополнительно внесенного субстрата // *Высокомолек. соед. А*. 2000. Т. 42. № 12. С. 2089–2096.
43. Yagudaeva E.Yu., Muidinov M.R., Kapustin D.V., Zubov V.P. Oxidative polymerization of aniline on the surface of insoluble solid poly(sulfo acids) as a method for the preparation of efficient biosorbents // *Rus. Chem. Bull., Int. Ed.* 2007. V. 56. № 6. P. 1–8.
44. Wei Z., Wan M. Synthesis and characterization of self-doped poly(aniline)-co-aminonaphthalene sulfonic acid nanotubes // *J. Appl. Polym. Sci.* 2003. V. 87. P. 1297–1301.
45. Иванов В.Ф., Грибкова О.Л., Чеберяко К.В., Некрасов А.А., Тверской В.А., Ванников А.В. Матричный синтез полианилина в присутствии поли-(2-акриламидо-2-метил-1-пропан)-сульфоновой

кислоты // *Электрохимия*. 2004. Т. 40. № 3. С. 339–345.

46. Guseva M.A., Isakova A.A., Gribkova O.L., Tverskoi V.A., Ivanov V.F., Vannikov A.V., Fedotov Yu.A. Matrix polymerization of aniline in the presence of polyamides containing sulfo acid groups // *Polym. Sci. Ser. A*. 2007. V. 49. № 1. P. 4–11.

47. Kabanov V.A., Aliev K.V., Kargina O.V., Patrikeeva T.I., Kargin V.A. Specific polymerization of vinylpyridinium salts. Polymerization on macromolecular matrixes // *J. Polym. Sci., Polym. Symp.* 1967. V. 16 (Pt. 2). P. 1079-1094.

48. Kabanov V.A., Papisov I.M. Formation of complexes between complementary synthetic polymers and oligomers in dilute solution // *Vysokomol. Soed. A*. 1979. V. 21. P. 243–281.

49. Kabanov V.A., Kargina O.V., Ulyanova M.V. Formation of crystalline polyelectrolytic complexes on matrix polymerization // *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.* 1976. V. 14. № 10. P. 2351–2356.

50. Polowiński S. Template polymerization. – Toronto: ChemTec Publishing, 1997. P. 146 p.

51. Kabanov V.A., Zezin A.B. Soluble interpolymeric complexes as a new class of synthetic polyelectrolytes // *Pure Appl. Chem.* 1984. V. 56. № 3. P. 343–354.

52. Kabanov V.A. Interpolymer complexes as new materials for biomedical applications // *Macromol. Chem., Macromol. Symp.* 1991. V. 48-49. P. 425–426.

53. 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. A*. 2009. V. 51. № 6. P. 675–682.

54. Robin J.J. Overview of the use of ozone in the synthesis of new polymers and the modification of polymers // *Adv. Polym. Sci.* 2004. V. 167. P. 235–245.

55. Сабуров В.В. Синтез композиционных перфторполимерсодержащих сорбентов и их использование в хроматографии биополимеров: дис. ... канд. хим. наук. – М., 1989. 134 с.

56. Pittman A.G. Fluoropolymers. – New York, London, Sydney, Toronto: Wiley-Interscience, 1972. 446 p.

57. Ponzio E.A., Echevarria R., Morales G.M., Barbero C. Removal of N-methylpyrrolidone hydrogen-bonded to polyaniline free-standing films by protonation-deprotonation cycles or thermal heating // *Polym. Int.* 2001. V. 50. P. 1180.

58. Pfaffl M.W. Chapter 3: Relative quantification / In: *Real-time PCR (Advanced methods series)* / Ed. M.T. Dorak. – Oxford: Taylor & Francis, 2006. P. 63–82.

59. Kapustin D., Prostyakova A., Bryk Ya., Yagudaeva E., Zubov V. New composite materials modified with nano-layers of functionalized polymers for bioanalysis and medical diagnostics / In: *Nanocomposites and polymers with analytical methods* / Ed. J. Cuppoletti. – Croatia: Intech, 2011. P. 83–106.

60. Liedberg B., Nylander C., Lundstrom I. Biosensing with surface plasmon resonance – how it all started // *Biosens. Bioelectron.* 1995. V. 10. P. i–ix.

61. Yang Y.H., Buckley M.J., Dudoit S., Speed T.P. Comparison of methods for image analysis on cDNA microarray data // *J. Comput. Graph. Statistics*. 2002. V. 11. № 1. P. 108–136.

62. Issaq H.J., Veenstra T.D., Conrads T.P., Felschow D. The SELDI-TOF MS approach to proteomics: Protein profiling and biomarker identification // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2002. V. 292. № 3. P. 587–592.

63. 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.

64. Vaccine-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