Проект «Дизайн и функционализация наноканалов мембран для селективного распознавания и количественного определения возбудителей кишечных инфекций с помощью ЭПР спиновых меток и зондов»

Соглашение о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидии в соответствии с пунктом 4 статьи 87.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации от 13 декабря 2022 г. № 075-15-2022-1251

Этап 1 (2022 год)

В рамках выполнения работ первого этапа проведены патентные исследования по 231 патентному документу в соответствии с ГОСТ 15.011-96, а также выполнен обзор и анализ 34 источников научно-технической литературы, нормативно-технической документации и других материалов в области селективного распознавания и количественного определения пищевых патогенных бактерий. По итогам работы установлен мировой уровень техники и технологии в области проводимых исследований.

Сравнение данного уровня с научным заделом исследовательской группы настоящего проекта показало, что имеющийся задел достаточен для дальнейшего успешного развития проекта. Так исследовательская группа настоящего проекта имеет богатый опыт и теоретические знания в области исследований твердотельных наноканальных сенсоров (тест-систем), обладает опытом изготовления биомиметических наноканалов, использующих процессы и механизмы селективного обнаружения и транспорта биомолекул, выполнила серию исследований органических наноканалов для биомолекулярного распознавания и транспортного поведения, в том числе специфического распознавания и обнаружения хиральных лекарственных средств, изучения транспорта белковых биомакромолекул в искусственных наноканалах и т.д. Членами коллектива сконструированы анионные и биомолекулярные сенсоры с анионными группами. Принцип их работы основан на распознавании анион-радикала фосфата и идентификации молекул АТФ (с группами аниона фосфата). Установлено, что ДНК как молекулу с анионной группой также можно идентифицировать, подобно молекуле АТФ, однако из-за сложности строения биомолекул их распознавание и обнаружение с помощью наноканалов не поддается количественной оценке. Таким образом, поиск качественного и количественного метода обнаружения является ключом к преодолению недостатков данного задела. Коллективом разработан новый пиллар[5]арен с бутоксифункциональными группами (WP5) на поверхности, который служит связующей единицей для белков, тогда как каналы используются для обратимой сборки и разборки с поверхностными группами. Это обеспечивает эффективную платформу для распознавания ДНК/РНК или белковых маркеров пищевых патогенных бактерий.

У коллектива исследовательской группы настоящего проекта имеется также многолетний опыт исследований электроповерхностных и кислотно-основных свойств пористых наноматериалов, включая пористые мембраны, с помощью ЭПР-спектроскопии спиновых меток и зондов. В отличие от оптических методов, имеющих некоторые ограничения для исследования пористых материалов, спектроскопия ЭПР позволяет вводить парамагнитные молекулы внутрь непарамагнитной матрицы любой морфологии. ЭПР спектроскопия спиновых зондов и меток проявляет лучшую концентрационную чувствительность по сравнению с твердотельным ядерно-магнитным резонансом (ЯМР). Ранее для изучения конформационных, структурных и динамических свойств белков широко применялся метод сайт-направленной спиновой метки. Спектроскопию ЭПР была нами также применена для изучения ориентации мутантов лизоцима Т4, адсорбированных на липидных бислоях и непористом наноразмерном кремнеземе. Компьютерное моделирование спектров ЭПР 6 мутантов лизоцима Т4, спин меченых в разных положениях, показало преимущественную ориентацию белковых молекул на поверхности углеродных нанотрубок. Вышеупомянутый метод ранее не применялся для изучения иммобилизации лизоцима из куриного яичного белка, который является наиболее коммерчески доступным ферментом. Российские ученые из состава коллектива настоящего проекта использовали компьютерное моделирование спектров ЭПР спин-меченого лизоцима из куриного яичного белка, иммобилизованного на поверхности ряда пористых оксидных носителей, определяли подвижность спиновой метки и преимущественную ориентацию белковых молекул на поверхности. Это указывает новую идею в сравнении с установленным по итогам работ первого этапа мировым уровнем развития техники и технологий, что дает эффективный и свободный с точки зрения интеллектуальных прав путь для решения проблемы количественного обнаружения пищевых патогенов в наноканалах функционализированных мембран.

На основании результатов литературного обзора и патентного поиска были выбраны MTSL радикал для спинмечения рРНК патогенных бактерий с целью их идентификации и количественного определения и  pH-чувствительный нитрокисильный радикал имидазолинового типа с 2-мя pKa 4-диметиламин-2-этил-5,5-диметил-2-пиридин-4-ил-2,5-дигидро-1Н-имидазол-1-оксил для исследования электроповерхностных свойств немодифицированных и функционализованных полимерных мембран. По причине своей высокой чувствительности метод ЭПР спиновых меток был определен в качестве метода исследования биосенсоров (рРНК молекул патогенных бактерий в порах функционализованных мембран).