



УДК 577.3

Новый метод диагностики аутоиммунных заболеваний, основанный на аффинной реакции на поверхности пьезокварцевого сенсора.
2. Исследование сорбции тиосоединений на золотых наночастицах и образования конъюгатов с анти-ДНК

Шашканова О.Ю., Ермолаева Т.Н.

Липецкий государственный технический университет, Липецк

Поступила в редакцию 17.07.2009 г.

Аннотация

Изучена функционализация поверхности золотых наночастиц различного размера меркаптопроизводными - ангидридом s-ацетилмеркаптоянтарной кислоты, 2-меркаптоэтиламино (цистамином), меркаптопроионовой кислотой и 11- меркаптоундеканолом и условия образования конъюгатов с антителами к ДНК. Оценена аффинность анти-ДНК к золотым наночастицам с хемосорбированными тиосоединениями и рассчитаны константы. Показано, что хемосорбция цистамина и 11-меркаптоундеканола на частицах диаметром 5 нм способствует формированию максимального плотного слоя, обеспечивающего образование прочных комплексов с антителами к ДНК.

Ключевые слова: золотые наночастицы, хемосорбция тиосоединений, цистамин, 11-меркаптоундеканол, конъюгаты с анти-ДНК, константа аффинности.

Functionalisation of surfaces gold nanoparticles of the different size by means of mercapto-substance (anhydride of s- acetylmercaptosuccinic acid, 2-mercaptoethylamine (cystamine), mercaptopropionic acid and 11-mercaptoundecanol) and formation condition of conjugate with antibodies to DNA are studied. Affinity anti-DNA to gold nanoparticles with chemisorbed thiosubstance is estimated and constants are calculated. Show, that chemisorption of cystamine and 11-mercaptoundecanol form on the particles of diameter 5 nm the maximally compact layer, which provides formation strong complexes with antibodies to DNA.

Key words: gold nanoparticle, dispersion, adsorption, surface activesubstances, thiocompound, spectrophotometry

Введение

К методикам анализа, предназначенным для ранней клинической диагностики, предъявляются жесткие требования по чувствительности, экспрессности и селективности. Известные в настоящее время методики определения антител к ДНК (Ат к ДНК) – биомаркеров аутоиммунных заболеваний, не обеспечивают выявление патологии в самом начале ее возникновения.

Пределы обнаружения биомаркеров гравиметрическими аффинными пьезокварцевыми сенсорами [1 - 3] можно снизить путем усиления аналитического сигнала. Поскольку аналитический сигнал пьезокварцевого сенсора пропорционален приращенной массе, в ходе проведения анализа возможно «утяжеление» присоединенных молекул с помощью наночастиц металлов и полимеров. Снижение предела обнаружения антител к ДНК можно ожидать в двухстадийном анализе, на первом этапе которого протекает аффинная реакция между ДНК, закрепленной на поверхности сенсора, и антителами пробы, а на втором – взаимодействие с образующимся аффинным комплексом золотых наночастиц (AuNP).

При реализации такого подхода необходимо обеспечить образование достаточно прочного конъюгата белковых молекул антител с AuNP. Повышение устойчивости конъюгата достигается предварительной функционализацией поверхности золотых наночастиц. При выборе модифицирующих соединений также необходимо учитывать:

возможную денатурацию белков при введении в систему избыточного количества модификатора;

пространственное строение образующихся между белковыми молекулами и золотыми наночастицами линкерных мостиков;

Априори можно прогнозировать формирование устойчивых белковых конъюгатов с золотыми наночастицами через линкеры на основе тиосоединений, обеспечивающих прочные координационные связи с золотой поверхностью [4].

Поэтому целью настоящего исследования являлось изучение условий тиолирования золотых наночастиц, установление аффинности золотых наночастиц к анти-ДНК.

Эксперимент

В работе применялись золотые наночастицы диаметром 5, 30 и 50 нм, синтезированные по методике, описанной в [5]; тиосоединения: 2-меркаптоэтиламин (цистамин) – (Cys); меркаптопроионовая кислота (МРА) и 11-меркаптоундеканол (11-MUD), (Sigma), ангидрид s-ацетилмеркаптоянтарной кислоты (AcMSA), (Serva). Растворы тиосоединений в 30%-ном водно-спиртовом растворе готовили по точной навеске.

Тиолирование золотых наночастиц проводилось при различном соотношении тиолирующих реагентов и золотых наночастиц (0,5 : 1; 1,5 : 1 и 2 : 1), рассчитанном согласно [6-8]. Процесс тиолирования AuNP контролировали спектрофотометрически (спектрофотометр СФ – 46) и методом пьезокварцевого микровзвешивания. В качестве физического преобразователя использовали резонаторы АТ – среза с золотыми электродами с собственной частотой колебаний 10 МГц (ЗАО «ЭТНА», Россия).

Иммобилизацию тиолированных золотых наночастиц (AuNPSH) проводили при нанесении фиксированного объема раствора тиолированного коллоидного золота на поверхность электрода и инкубировании в течение 10-12 ч при температуре 4 °С. Максимальное изменение частоты колебания (Δf) регистрировали при образовании на поверхности комплекса анти-ДНК с золотыми наночастицами при пропускании раствора АТ к ДНК через ячейку с пьезокварцевым сенсором. Для регенерации биорецепторного слоя применяли бидистиллированную воду, при этом сигнал сенсора возвращался к базовому значению.

Константу аффинности $K_{\text{АФ}}$ анти-ДНК к тиолированным наночастиц определяли по методике Скэтчарда, описанной в [9], как отношение констант скоростей прямой и обратной реакции.

Результаты и обсуждения

При взаимодействии золотых наночастиц с цистамином, меркаптопропионовой кислотой, 11-меркаптоундеканолом и ангидридом s-ацетилмеркаптоянтарной кислоты происходит образование сульфидных связей с поверхностью металла и формирование мостиков различной длины и пространственного строения, отличающихся природой концевых функциональных групп.

Хемосорбции цистамина на поверхности AuNP предшествует разрыв дисульфидной связи и присоединение двух частей молекулы с образованием коротких линкерных структур с активными NH_2 -группами на конце (рис. 1а). МРА сорбируется на золотой поверхности за счет сульфидной связи, образуя углеводородную цепочку с концевой COOH – группой (рис. 1б), обуславливающей возникновение водородных связей с молекулами воды и с соединениями с карбоксильными группами, что приводит к частичной дезактивации активных центров. Присутствие гетерогенного пятичленного цикла с двумя карбонильными группами в молекуле ангидрида s-ацетилмеркаптоянтарной кислоты (рис. 1в) оказывает стерические затруднения при взаимодействии с коллоидными частицами, приводящие к снижению плотности хемосорбированных поверхностных групп, и так же склонных образовывать водородные связи с молекулами воды и друг с другом.

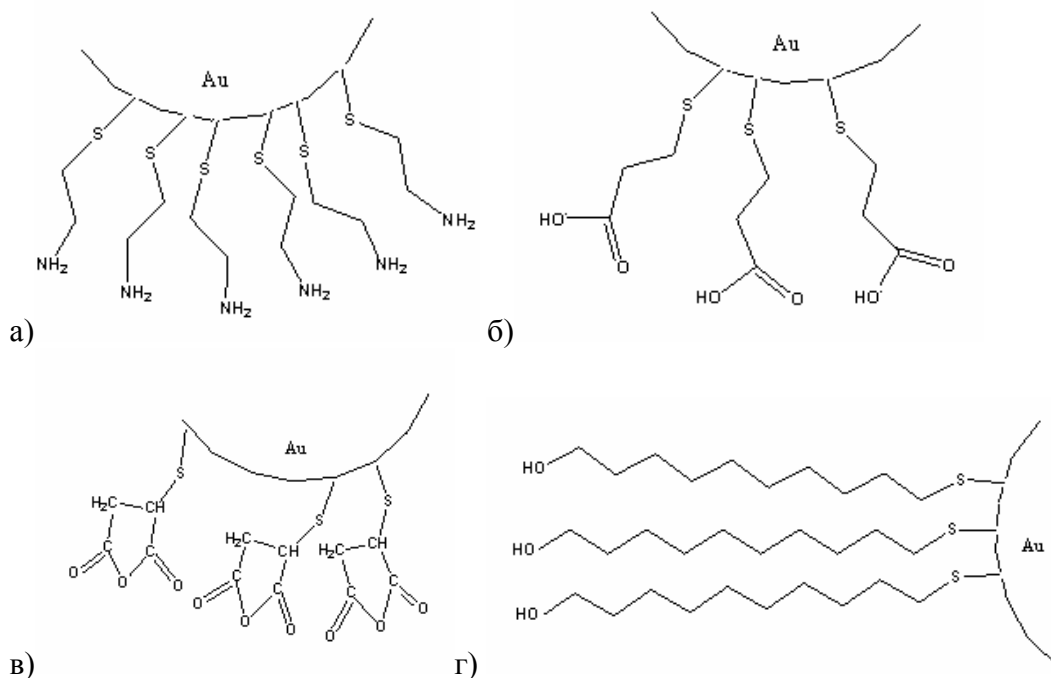


Рис. 1. Схема тиолирования поверхности золотых наночастиц:
 а - цистамином, б – меркаптопропионовой кислоты,
 в – ангидридом s-ацетилмеркаптоянтарной кислоты, г – меркаптоундеканолом

При сорбции 11 – меркаптоундеканола образуется достаточно гибкий протяженный линейный мостик из (CH₂-) - группировок с концевой гидроксильной группой, доступной для взаимодействия с молекулами антител (рис. 1г).

На спектрах поглощения AuNPSH наблюдается смещение максимума светопоглощения (A_{\max}) на 5-10 нм по сравнению с немодифицированными частицами (рис. 2), положение которого зависит от природы применяемого тиосоединения - наличие функциональных групп и электростатических взаимодействий, а также передачи электронов от молекул лиганда к золоту [10-13]. Минимальное смещение A_{\max} отмечается для частиц, модифицированных меркаптопропионовой кислотой, что свидетельствует об изменении внешней сольватной оболочки при взаимодействии не только с водой, но и с соседними наночастицами, и существенной дезактивации концевых групп.

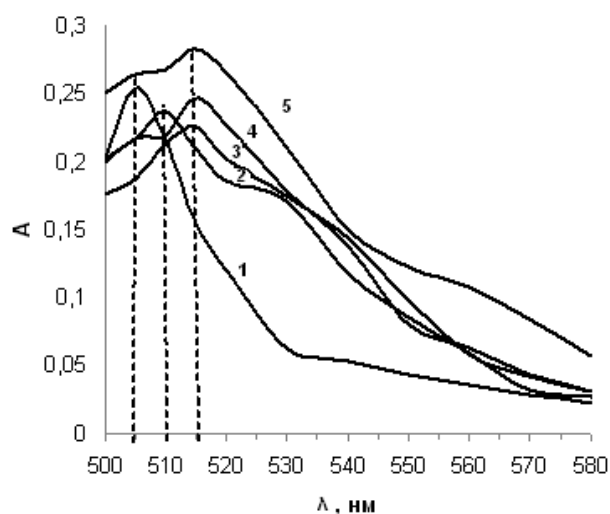


Рис. 2. Спектры светопоглощения золотых наночастиц (1) и тиолированных с помощью меркаптопропионовой кислоты (2), ангидрида s-ацетилмеркаптоянтарной кислоты (3), 11- меркаптоундеканола (4) и цистамина (5). Соотношение S/Au = 2

В остальных случаях A_{\max} смещается примерно на одну величину, однако для AuNPSH, модифицированных цистамином, наблюдается максимальное значение оптической плотности, свидетельствующее о высокой плотности присоединенных функциональных групп.

Эффективность взаимодействия A_t к ДНК с золотыми наночастицами так же оценивали методом пьезокварцевого микровзвешивания при пропускании раствора биомолекул над поверхностью сенсора с закрепленными на ней AuNP (рис. 3).

Максимальное значение Δf зарегистрировано для сенсора с частицами, тиолированными цистамином, что свидетельствует о хемосорбции оптимального количества конформационно доступных для взаимодействия с антителами линкеров с концевыми NH₂ – группами. Аналитический сигнал при применении частиц, модифицированных 11–меркаптоундеканолом несколько ниже, что связано с уменьшением доли поверхностных функциональных групп по сравнению с цистамином, при одинаковой концентрации тиосоединений, применяемых при функционализации. Однако длинные линкерные мостики 11-MUD повышают доступность терминальных OH – групп для взаимодействия с молекулами антител и Δf снижается лишь на 11 Гц. Для сенсоров с наночастицами, тиолированными МРА и AcMSA, Δf в 2-3 раза ниже по сравнению с цистамином, что объясняется как строением (рис. 1), так и частичной дезактивацией групп.

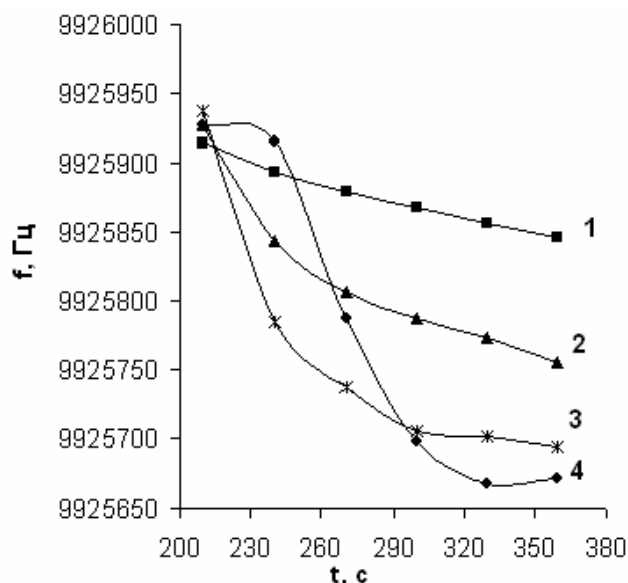


Рис.3. Влияние природы тиолирующего реагента на аналитический сигнал (d_{AuNP} 30 нм). Тиолирующие реагенты: 1 - ангидрид s-ацетилмеркаптоянтарной кислоты, 2 - меркаптопроионовая кислота 3 - 11- меркаптоундеканол и 4 - цистамин

На величину аналитического сигнала влияет не только природа тиолирующего агента, но и соотношение концентраций реактивов (тиосоединения/золотые наночастицы – S/Au). При применении двукратного избытка тиосоединения по отношению к частицам коллоидного золота образуется максимальное количество функциональных групп на поверхности частиц. В то же время уменьшение концентрации тиореагента ($S/Au < 2$) приводит к снижению плотности поверхностных функциональных групп, о чем свидетельствуют невысокие значения Δf . Увеличение же соотношения $S/Au > 2$ способствует формированию полимолекулярных слоев тиолирующих агентов, утяжеляющих частицы, что вызывает срыв колебаний сенсора уже на стадии иммобилизации. (рис. 4).

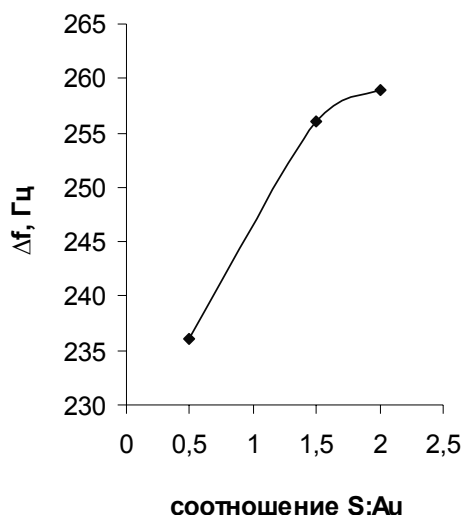


Рис 4. Влияние соотношения концентраций реагентов S/Au на аналитический сигнал сенсора (d частиц 30 нм, тиолирующий агент – цистамин; $C_{Au} = 3,08$ мкг/мл, конц. $HAuCl_4$ 0,3 мМ)

Аналитический сигнал сенсора также связан с размером применяемых наночастиц. Максимальное значение Δf отмечается для частиц диаметром 5 нм (рис. 5) с более высокой долей поверхностных активных центров для связывания с тиогруппами и биомолекулами. Поэтому Δf сенсора с иммобилизованными частицами диаметром 5 нм выше (341 Гц), чем для частиц 50 нм (174 Гц).

Константу аффинности K_{AF} AuNPSH к анти – ДНК определяли по результатам кинетических исследований [8] (рис. 6). Угловой коэффициент функциональной зависимости скорости реакции от частоты колебания сенсора и отрезок, отсекаемый на оси ординат, позволили рассчитать константы скорости образования k_o и разрушения k_p комплекса AuNP с Ат к ДНК и константу K_{AF} (рис.7).

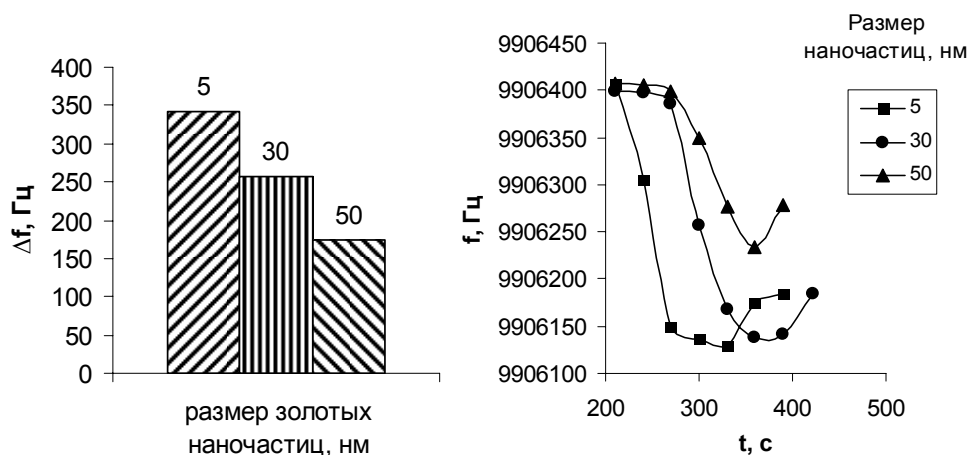


Рис 5. Влияние размера наночастиц, тиолированных с помощью цистамина на величину аналитического сигнала сенсора (соотношение S/Au =2)

Таблица 1. Сравнение кинетических и равновесных характеристик при взаимодействии анти – ДНК с тиолированными золотыми наночастицами

Тиолирующие реагенты	k_o , ($M^{-1} \times c^{-1}$)	$k_p \cdot 10^3$, (c^{-1})	$K_{AF} \cdot 10^{-5}$ ($mol^{-1} \cdot l$)
2-меркаптоэтиламин (цистамин)	13597	83,6	1,626
Ангидрид s-ацетилмеркаптоянтарной кислоты	625	3,82	1,637
Меркаптопропионовая кислота	5136	31,6	1,626
11-меркаптоундеканол	6953	42,8	1,625

Высокое значение k_o для частиц, тиолированных цистамином, может быть объяснено лучшей конформационной доступностью поверхностных NH_2 – групп для связи с антителами. Напротив, присутствие объемной ангидридной группировки в молекуле AcMSA замедляет процессы, как образования, так и разрушения комплекса и увеличивает продолжительность его образования. Регенерацию рецепторного слоя в этом случае необходимо проводить в более жестких условиях

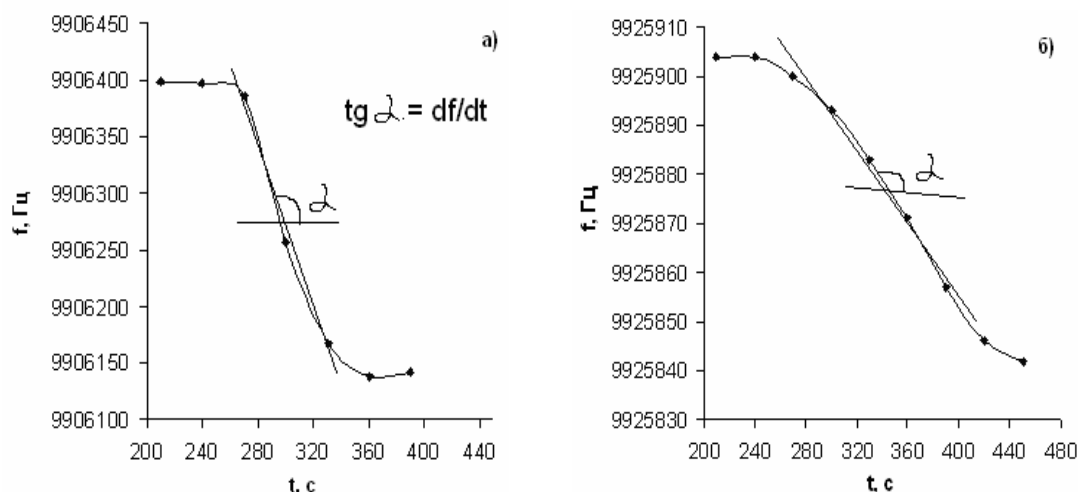


Рис 6. Кинетическая зависимость аналитического сигнала сенсора при связывании антител к ДНК (3,08 мкг/мл) с золотыми наночастицами, тиолированными а) цистамином б) ангидридом s-ацетилмеркаптоянтарной кислоты

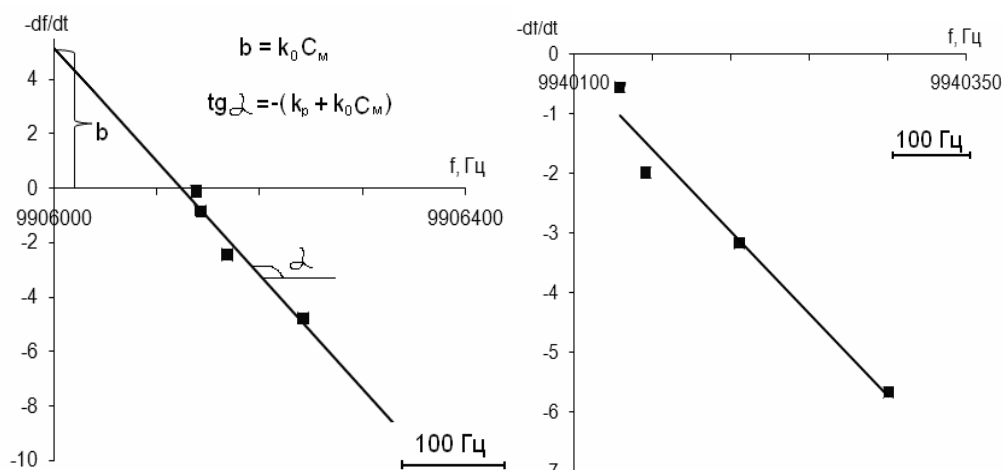


Рис 7. Графическое определение констант скорости образования и разрушения комплекса антител к ДНК с золотыми наночастицами, тиолированных с помощью а) с помощью цистамина б) ангидрида s-ацетилмеркаптоянтарной кислоты

Изучение процессов образования AuNPSH позволило обосновать выбор как функционализирующего реагента, так и условий конъюгации тиолированных золотых наночастиц с анти-ДНК. При применении цистамина и 11-меркаптоундеканола наблюдаются максимальные значения Δf и следовательно они могут быть рекомендованы для определения антител к ДНК с помощью пьезокварцевого аффинного сенсора.

Заключение

Показано, что золотые наночастицы диаметром 5 нм, тиолированные цистамином и 11-меркаптоундеканолом, способствует получению более высоких

значений аналитического сигнала и могут быть рекомендованы для использования в пьезокварцевых аффинных ДНК-сенсорах.

Список литературы

1. Fakhrullin RF, Vinter VG, Zamaleeva AI, Matveeva MV, Kourbanov RA, Temesgen BK, Ishmuchametova DG, Abramova ZI, Konovalova OA, Salakhov MK. Quartz crystal microbalance immunosensor for the detection of antibodies to double-stranded DNA. // *Anal Bioanal Chem.* 2007. 388 (2) P. 367-375.
2. Шашканова О.Ю., Калмыкова Е.Н., Ермолаева Т.Н. Пьезокварцевый иммуносенсор для диагностики аутоиммунных заболеваний. // XVII Российская молодежная научная конференция "Проблемы теоретической и экспериментальной химии" (17-20 апреля 2007, Екатеринбург). С.16.
3. Шашканова О.Ю., Калмыкова Е.Н., Ермолаева Т.Н. Пьезокварцевый иммуносенсор для диагностики аутоиммунных и инфекционных заболеваний // VII Всерос. конф. по электрохим. методам анализа с межд. участием "ЭМА - 2008" (1-6 июня 2008, Уфа - Абзаково). С.127.
4. Zhang Jin Z., Noguez Cecilia. Plasmonic optical properties and applications of metal nanostructures // *Plasmonics.* 2009. V. 3:4. P. 127-150.
5. Шашканова О.Ю., Ермолаева Т.Н. Применение золотых наночастиц для повышения аналитического сигнала пьезокварцевого ДНК – сенсора. I. Синтез и стабилизация золотых наночастиц в водных растворах // Сорбц. и хроматограф. процессы [в редакции].
6. Kimura K., Yao H., Sato S. Self-assembling of gold and silver nanoparticles at a hydrophilic/hydrophobic interface: a synthetic aspect and superstructure formation // *Synthesis and reactivity in inorganic, metal-organic and nano-metal chemistry.* 2006. V. 36. P. 237-264.
7. Mikhlin Yu., Likhatski M., Yaroslavtseva I. and Borisova Z. A study of the immobilized products of tetrachloraurate reduction by sulphide ions // *Journal of Siberian Federal University. Chemistry* 2. 2008. V. 1. P. 142-150.
8. Love J. C., Estroff L. A., Kriebel J. K., Nuzzo R. G., Whitesides G. M. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology // *Chemical Reviews.* 2005. V. 105(4). P. 1103-1169.
9. Калмыкова Е.Н., Дергунова Е.С., Ермолаева Т.Н. Кинетические исследования аффинного взаимодействия и их применение при разработке пьезокварцевых иммуносенсоров // Сорбц. и хроматограф. процессы. 2004. Т.4. Вып. 5. С. 597-605.
10. Philp D., Stoddart J.F. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 1996. V. 35. P. 1154.
11. Decher G., Sauvage J.P., Layered nanoarchitectures via directed assembly of
12. anionic and cationic molecule // Hosseini M.W. In *comprehensive supramolecular chemistry.* Elsevier science: Oxford. 1996. V. 9. P. 507-528.
13. Fredericks J.R., Hamilton M.W. Elsevier science: Oxford. 1996. V.9. P. 565-594.
14. Taranekar P., Huang C., Fulghum T.M., Baba A., Jiang G., Park J.-Y., Advincula R. C. Nanocomposite films of a polyfluorene copolymer and carbazole–thiol-capped gold nanoparticles: electrochemical crosslinking and energy-transfer properties // *Adv. Funct. Mater.* 2008. V. 18. P. 347–354.

Шашканова Ольга Юрьевна – аспирант кафедры химии Липецкий государственный технический университет, кафедра химии, Липецк

Ермолаева Татьяна Николаевна - д.х.н., профессор, зав. кафедрой химии, Липецкий государственный технический университет, Липецк

Shashkanova Olga Yu. – Post-graduate Chemistry Department, Lipetsk State Technical University, Lipetsk

Ermolaeva Tatyana N. – D.Sc (Chemistry), Professor, Head of the Chemistry Department, Russia, Lipetsk State Technical University, Chemistry Department, Lipetsk, e-mail: ermolaeva@stu.lipetsk.ru