
BIOSENSORS

БІОСЕНСОРИ

УДК 681.586 + 577.113

ДОСЛІДЖЕННЯ РІВНЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ОЛІГОНУКЛЕОТИДІВ НА ПОВЕРХНІ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ЗА ДОПОМОГОЮ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПІДХОДУ З ВИКОРИСТАННЯМ ФЛУОРОФОРА Cu_3

М. Й. Мацішин, О. Е. Рачков, А. А. Галушкіна, О. П. Солдаткін

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, м. Київ 03680, вул. Заболотного, 150, тел. (044) 526-4397, факс (044) 526-0759,

²Інститут високих технологій Київського національного університету імені Т. Шевченка, м. Київ, 02003, просп. Глушкова, 4 г, тел. 044-2000328, e-mail: matsishinnicolas@gmail.com; oleksandr_rachkov@yahoo.com; Nastasia-Galushkina@yandex.ua; a_soldatkin@yahoo.com

ДОСЛІДЖЕННЯ РІВНЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ ОЛІГОНУКЛЕОТИДІВ НА ПОВЕРХНІ НАНОЧАСТИНОК ЗОЛОТА ЗА ДОПОМОГОЮ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПІДХОДУ З ВИКОРИСТАННЯМ ФЛУОРОФОРА Cu_3

М. Й. Мацішин, О. Е. Рачков, А. А. Галушкіна, О. П. Солдаткін

Анотація. Проведено дослідження рівня іммобілізації олігонуклеотидів на поверхні наночастинок золота при розробці нанобіосенсорів за допомогою запропонованого експериментального підходу. Цей підхід для контролю кількості іммобілізованого матеріалу базується на визначенні залишкової концентрації вільних (неіммобілізованих) тіолованих олігонуклеотидів з ковалентно приєднаним флуорофором Cu_3 . Було показано, що ефективність іммобілізації олігонуклеотидів на поверхні наночастинок золота, стабілізованих цитрат-іонами, сильно залежить від іонної сили середовища і суттєво залежить від температури та часу іммобілізації. При підвищенні іонної сили середовища спостерігаються два процеси: початкова зміна іонної сили (від 0 до 15-20 мМ) веде до підвищення ефективності іммобілізації олігонуклеотидів, при подальшому підвищенні іонної сили починає спостерігатися процес агрегації наночастинок золота, що перешкоджає подальшій ефективній іммобілізації олігонуклеотидів.

Ключові слова: наночастинок золота, локалізований поверхневий плазмонний резонанс, флуоресценція, олігонуклеотид P2-Cu_3 , рівень іммобілізації

INVESTIGATIONS OF THE LEVEL OF OLIGONUCLEOTIDE IMMOBILIZATION ON THE SURFACE OF GOLD NANOPARTICLES USING EXPERIMENTAL APPROACH WITH FLUOROPHORE Cy3

M. Matsishin, A. Rachkov, A. Halushkina, A. Soldatkin

Abstract. The level of oligonucleotide immobilization on the surface of gold nanoparticles for the nanobiosensor development was studied using a proposed experimental approach. This approach for evaluation of the amount of immobilized material is based on the measurement of the residual concentration of free (unimmobilized) thiolated oligonucleotides with covalently attached fluorophore Cy3. It was shown that the efficiency of immobilization of oligonucleotides on the surface of citrate-stabilized gold nanoparticles is strongly dependent on the ionic strength of the medium as well as on the temperature and time of immobilization. Along with increase of ionic strength of the medium, two processes are observed: change in ionic strength (from 0 to 15-20 mM) leads to more effective immobilization of oligonucleotides, and a further increase of ionic strength leads to aggregation of gold nanoparticles, which impedes further effective immobilization of oligonucleotides.

Keywords: gold nanoparticles, localized surface plasmon resonance, fluorescence, oligonucleotide P2-Cy3, immobilization level

ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ ОЛИГОНУКЛЕОТИДОВ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОЧАСТИЦ ЗОЛОТА С ПОМОЩЬЮ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПОДХОДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРОФОРА Cy3

М. И. Мацишин, А. Э. Рачков, А. А. Галушкина, А. П. Солдаткин

Аннотация. Проведены исследования уровня иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности наночастиц золота при разработке нанобиосенсоров с помощью предложенного экспериментального подхода. Этот подход для контроля количества иммобилизованного материала основан на определении остаточной концентрации свободных (неиммобилизованных) тиолированных олигонуклеотидов с ковалентно присоединенным флуорофором Cy3. Было показано, что эффективность иммобилизации олигонуклеотидов на поверхности наночастиц золота, стабилизированных цитрат-ионами, сильно зависит от ионной силы среды и существенно зависит от температуры и времени иммобилизации. При повышении ионной силы среды наблюдаются два процесса: начальное изменение ионной силы (от 0 до 15-20 мМ) ведет к повышению эффективности иммобилизации олигонуклеотидов, при дальнейшем повышении ионной силы начинает наблюдаться процесс агрегации наночастиц золота, который препятствует дальнейшей эффективной иммобилизации олигонуклеотидов.

Ключевые слова: наночастицы золота, локализованный поверхностный плазмонный резонанс, флуоресценция, олигонуклеотид P2-Cy3, уровень иммобилизации.

1. Вступ

У порівнянні з макроскопічним золотом наночастинки золота (AuNPs) демонструють унікальні фізико-хімічні властивості, пов'язані зі значно більшим співвідношенням між їхніми поверхнею та об'ємом і, відповідно, значно

вищою поверхневою концентрацією вільних електронів [1-6]. При взаємодії приповерхневих електронів наночастинок золота з електромагнітними хвилями виникають особливі коливання цих електронів, що отримали назву явища локалізованого поверхневого плазмонного резонансу (ЛППР). В залежності від

довжини хвилі та параметрів наночастинок (їх розміру, форми, хімічного складу) світло розсіюється і поглинається [7]. AuNPs мають винятково високі коефіцієнти оптичного поглинання, що дозволяє розробку методів оптичного детектування зі значно більш високою чутливістю у порівнянні зі звичайними барвниками. Колоїдний розчин AuNPs показує інтенсивний пік поглинання в районі 520 нм, пов'язаний з явищем ЛППР. Форма і положення цього піка є чутливими до змін середовища. Якщо такі зміни викликають, наприклад, агрегацію AuNPs, то завдяки взаємодії поверхневих плазмонів наночастинок, що зближуються, відбувається розширення плазмонної смуги при значному її зміщенні у довгохвильову (червону) частину спектру [8, 9].

Через значну поверхневу енергію AuNPs є агрегативно нестійкими [10], тому їх необхідно стабілізувати іонами (наприклад, цитрат-іонами, які адсорбуються на поверхні AuNPs під час процедури їх приготування, і завдяки електростатичному відштовхуванню не дозволяють вандерваальсовим силам зблизити наночастинки і викликати їх агрегацію) [11]. Зміна кольору при агрегації AuNPs є основою популярного застосування для колориметричного зондування будь-якого таргета (досліджуваної речовини), що прямо або опосередковано викликає агрегацію AuNPs [5, 12]. Група Міркіна була першою у використанні керованої агрегації AuNPs для розробки біосенсорів на основі гібридизації ДНК, що викликає формування великих агрегатів із окремих наночастинок, модифікованих короткими фрагментами одноланцюгової ДНК [13]. Крім розробки нанобіосенсорів, існує також ряд інших застосувань наночастинок золота модифікованих олігонуклеотидами (DNA-AuNPs): вони ефективні в комбінаціях з наночастинами іншого хімічного складу, наприклад при відокремленні цільової ДНК у магнітному полі [14], при конструюванні нових матеріалів основаних на самозбиранні DNA-AuNPs [15] тощо.

Успішність всіх застосувань DNA-AuNPs в значній мірі залежить від такого важливого параметра як поверхнева густина іммобілізованих олігонуклеотидів або, іншими словами, від рівня їх іммобілізації. Взагалі, описано чи-

мало експериментальних підходів визначення рівня іммобілізації олігонуклеотидів на золотій поверхні [16, 17]. На жаль такі методи як рентгенівська фотоелектронна спектроскопія (XPS) або атомно-силова мікроскопія (AFM) нам недоступні через відсутність відповідного обладнання. Інші, такі як інфрачервона спектроскопія (FT-IR) або електронна абсорбційна спектроскопія (UV-vis) – не дуже чутливі. Так, електронна абсорбційна спектроскопія не може забезпечити чутливість до концентрацій олігонуклеотидів менших ніж декілька мікро-молів на літр, що для типового розчину наночастинок наномолярної концентрації відповідає як мінімум кільком сотням олігонуклеотидних проб на одну наночастинку. Методи з використанням радіоактивних міток є досить небезпечними. Позитивною альтернативою видаються методи з використанням флуоресцентних міток, що не мають перерахованих вище недоліків. Простота в використанні, відсутність загрози здоров'ю, широкий діапазон чутливості дозволяє визначити концентрацію ДНК до наномолярних значень. На жаль, прямий метод визначення поверхневої густини флуоресцентно мічених олігонуклеотидів неможливий тому, що золоті наночастинки ефективно гасять флуоресценцію [18]. Саме тому необхідно використовувати альтернативні, непрямі методи визначення. В літературі згадуються принаймні два такі підходи: відновлення інтенсивності флуоресценції мітки завдяки таким конформаційним змінам олігонуклеотидних проб, що збільшують відстань між флуорофором і золотою поверхнею [19], витіснення олігонуклеотидів з ковалентно приєднаною флуоресцентною міткою з поверхні наночастинок і подальше визначення їх кількості в розчині [20]. Наведені підходи мають свої недоліки і не завжди підходять для використання в тих чи інших умовах. В першому випадку важко точно встановити відсоток відновлення флуоресценції іммобілізованих мічених олігонуклеотидів, у другому – ефективність витіснення попередньо іммобілізованих олігонуклеотидів з поверхні наночастинок золота також залишається невідомою. Все це ставить під сумнів можливість більш-менш точного розрахунку поверхневої густини олігонуклеотидів. Тому для дослідження

ефективності взаємодій між олігонуклеотидами та наночастинками золота необхідно було розробити такий експериментальний підхід, що дозволяв би в наших умовах надійно визначати кількість іммобілізованого матеріалу з використанням флуоресцентно мічених олігонуклеотидів.

Як олігонуклеотид-пробу для іммобілізації на поверхні AuNPs було вибрано послідовність **P2** (ACCCACAAGCGCCGACTGTTG), яка є фрагментом гена *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis*, що кодує послідовність 27 амінокислот бета-субодиниці РНК-полімерази і мутації якого викликають резистентність мікобактерій до антибіотиків [21]. Вибір цього об'єкта досліджень пояснюється тим, що глобальною проблемою є стрімке зростання частоти захворювань, які спричиняють саме стійкі до антибіотиків штами *M. tuberculosis*. Мікобактерії туберкульозу, зростають вкрай повільно в лабораторії і вимагають 2-9 тижнів інкубації на твердому середовищі [22]. Це повільне зростання часто призводить до небезпечної затримки в діагнозі. Розробка відповідних нанобіосенсорних методів могла б суттєво прискорити діагностування.

Тому метою даної роботи були розробка експериментального підходу з використанням флуорофора СуЗ, ковалентно приєднаного до олігонуклеотиду, послідовність якого відтворює фрагмент гена *rpoB* *M. tuberculosis*, пов'язаного з виникненням резистентності мікобактерій до антибіотиків, та його використання для визначення рівня іммобілізації олігонуклеотидів на поверхні наночастинок золота і дослідження факторів, що впливають на цей рівень.

2. Матеріали та методи

2.1. Матеріали

В роботі використовували 6-меркапто-1-гексанол (МСН), („Fluka”, Швейцарія), цитрат натрію, HAuCl_4 та NaCl ("Sigma", США). Одноланцюговий олігодезоксинуклеотид P2-СуЗ, який відтворює послідовність фрагмента так званої ділянки, що визначає резистентність до рифампіцину (англійською, - rifampicin resistance defining region), гена *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis* [21], який на 5'-кінці має SH-

групу, і до 3'-кінця якого був ковалентно приєднаний флуоресцентний барвник СуЗ [SH-(CH_2)₆-ACCCACAAGCGCCGACTGTTG-СуЗ] був синтезований "Biomers net GmbH" (Німеччина). Для приготування розчинів використовували деіонізовану воду Milli Q (тип I, R = 18,2 МΩ см), отриману за допомогою установки „Simplicity Water Purification” („Millipore”, США).

2.2. Обладнання

В цьому дослідженні було використано настільну лабораторну центрифугу “miniSpin” (“Eppendorf”) для відділення наночастинок золота від розчинених компонентів, спектрофотометр "NanoDrop 2000", що дозволяє визначати спектри поглинання в зразках об'ємом 2 мкл та універсальний скануючий спектрофлуориметр "VICTOR3™ 1420" для визначення флуоресцентного відгуку протягом 0,1 с. Спектри поглинання немодифікованих, стабілізованих цитрат-іонами AuNPs реєстрували за допомогою спектрофотометра “Unico SQ-4802”. Розроблений в Інституті фізики напівпровідників ім. В.Є. Лашкарьова НАН України нанобіосенсор «НаноПлазмон-003» використовували для дослідження процесів агрегації AuNPs.

2.3. Синтез наночастинок золота

Найбільш простим і поширеним методом приготування AuNPs є відновлення золота з окисненого стану у складі тетрахлораурат-іонів (AuCl_4^-) цитратом натрію у водних розчинах при кипінні [23]:



Для приготування вихідних розчинів 6,8 мг HAuCl_4 розчиняють в 20 мл деіонізованої води Milli Q (1 мМ HAuCl_4) і 0,1 г $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в 10 мл дистильованої води (1 % цитрату натрію). Спочатку при постійному помішуванні нагрівають з оберненим холодильником 20 мл 1 мМ HAuCl_4 до кипіння. Додають до нього 2 мл 1 % цитрату натрію. Протягом 10 хвилин продовжують нагрів і перемішування. Поступово іони золота відновлюються, і колір розчину стає насичено-червоним. Після цього розчин охолоджують до кімнатної темпера-

тури. За допомогою такого метода отримують монодисперсні сферичні AuNPs діаметром 10-20 нм, що завдяки слабо зв'язаному покриттю з цитрат-іонів мають негативний поверхневий заряд і характеризуються плазмонною смугою поглинання при ~520 нм [24, 25]. При умові, що всі іони золота були хімічно відновлені і увійшли до складу наночастинок, середній діаметр яких дорівнював 13 нм, концентрація отриманого препарату AuNPs складає 13 нМ.

3. Результати досліджень

Розробка експериментального підходу визначення рівня іммобілізації флуоресцентно мічених олігонуклеотидів на поверхні наночастинок золота по залишковій концентрації вільних олігонуклеотидів

Для вивчення залежності рівня іммобілізації олігонуклеотидів на поверхні наночастинок золота від низки умов і факторів був запропонований експериментальний підхід з використанням ковалентно приєднаного флуоресцентного барвника СуЗ, а саме, визначення кількості іммобілізованого матеріалу по залишковій концентрації вільних (неіммобілізованих) олігонуклеотидів.

Суть методу полягає у визначенні по інтенсивності флуоресценції різниці між концентрацією вільних олігонуклеотидів до і після іммобілізації. Точніше кажучи, різниця визначається між рівнем флуоресценції розчину заданої концентрації вихідного розчину олігонуклеотидів ($F_{вих}$) і рівнем флуоресценції у супернатанті ($F_{супернат}$), отриманому після відповідної інкубації суміші олігонуклеотидів такої ж кінцевої концентрації з AuNPs та її центрифугування. Центрифугування необхідне для осадження наночастинок золота з іммобілізованими на їх поверхні олігонуклеотидами; при цьому в супернатанті залишаються тільки вільні (неіммобілізовані) олігонуклеотиди. Отримана різниця дозволяє визначити кількість іммобілізованих олігонуклеотидів, що, в свою чергу, дозволяє розрахувати ефективність іммобілізації відповідно до формули

$$\eta = \frac{F_{вих} - F_{супернат}}{F_{вих}} \cdot 100\%,$$

а також, середню кількість іммобілізованих олігонуклеотидів на одну наночастинку.

Успішність застосування зазначеного експериментального підходу в значній мірі залежить від повноти осадження наночастинок золота під час центрифугування. Принаймні, конче потрібно, щоб ті фракції супернатанта, в яких буде визначатися концентрація вільних (неіммобілізованих) олігонуклеотидів, містили якомога менше наночастинок золота. Тому був проведений відповідний пошук умов осадження наночастинок золота. Рис. 1 показує, що центрифугування розчину AuNPs протягом 30 хв при 12000 об/хв дає таке значення поглинання супернатанта, що є статистично нерозрізним від значення поглинання деіонізованої води. Тому можна вважати, що ці умови забезпечують цілком задовільну повноту осадження наночастинок золота.

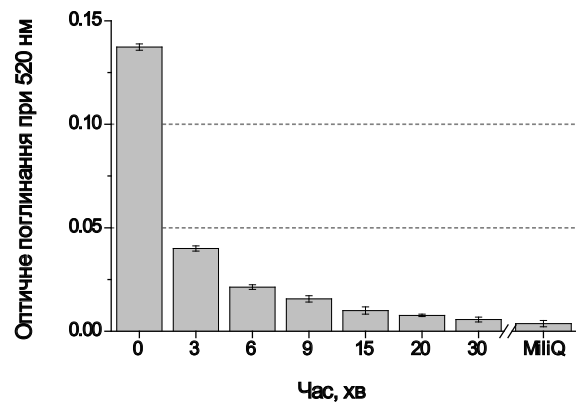
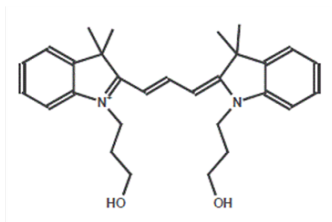


Рис. 1. Залежність рівня поглинання при 520 нм (рівня ефективності осадження AuNPs) супернатанта розчину 3,25 нМ AuNPs від часу центрифугування при 12000 об/хв.

Як вже згадувалось, фрагмент гена *rpoB* *Mycobacterium tuberculosis*, що кодує послідовність 27 амінокислот бета-субодиниці РНК-полімерази і мутації якого викликають резистентність мікобактерій до антибіотиків, був обраний як олігонуклеотид-проба для іммобілізації на золотій поверхні. Ця послідовність отримала назву Р2. Для орієнтованої іммобілізації олігонуклеотидів Р2 використовують здатність атому сірки в складі SH-групи формувати міцний хімічний зв'язок з атомами золота. Тому олігонуклеотиди Р2 (проби для іммобілізації) були тіюльовані на 5'-кінці, а до

їх 3'-кінця був ковалентно приєднаний флуоресцентний барвник Су3 (Рис. 2).



P2-Cy3: HS-(CH₂)₆-**ACCCACAAGCGCCGACTGTTG-Cy3**

Рис. 2. Хімічна структура флуоресцентного барвника Су3 і послідовність олігонуклеотида-проби P2-Cy3.

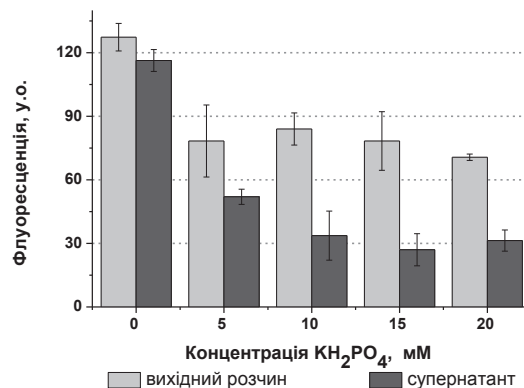
Вимірювання рівня флуоресценції Су3 ковалентно приєднаних до олігонуклеотидів P2 є відносно простим і надійним методом кількісного визначення концентрації олігонуклеотидів через наявність залежності між ними. Ця залежність, що виявилась лінійною в усьому діапазоні досліджуваних концентрацій (до 200 нМ), може бути описана рівнянням $y = 11,0x + 41,8$. Межа кількісного визначення складала 5 нМ P2-Cy3. Це приблизно на три порядки краще, ніж при спектрофотометричному дослідженні немічених олігонуклеотидів (при $\lambda = 260$ нм), яке дозволяє кількісне визначення лише мікромолярних концентрацій олігонуклеотидів, що при звичайній (нанолярній) концентрації наночастинок золота дозволяє визначати тільки дуже високий рівень поверхневої густини іммобілізованих олігонуклеотидів (не менше кількох сотень молекул на одну наночастинку).

Дослідження умов, що впливають на процес іммобілізації з використанням експериментального підходу визначення рівня іммобілізації флуоресцентно мічених олігонуклеотидів на поверхні наночастинок золота по залишковій концентрації вільних олігонуклеотидів

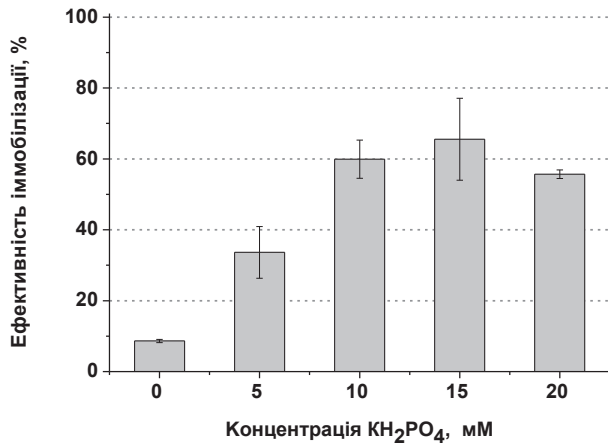
Розроблений підхід був застосований для дослідження впливу низки чинників на ефективність іммобілізації олігонуклеотидів P2-Cy3 на поверхні AuNPs. Як відомо, за фізіологічних умов негативно заряджені фрагменти ДНК відштовхуються один від одного; це, без-

перечно, заважає в досягненні високої поверхневої густини їх іммобілізації. Змінюючи іонну силу та рН середовища, можна вплинути на цей показник: при зменшенні величини рН збільшується ступінь протонності фосфатних залишків олігонуклеотидів (тобто зменшується величина їх заряду), а збільшення іонної сили призводить до поступового екранування негативно заряджених фосфатних залишків олігонуклеотидів проти-іонами буферного розчину. В обох випадках електростатичне відштовхування між олігонуклеотидами зменшується, що має сприяти збільшенню їхньої поверхневої густини при іммобілізації на поверхні AuNPs.

Дійсно, як видно на рис. 3, збільшення концентрації розчину КН₂Р₄ від 0 до 15 мМ призводить до збільшення ефективності іммобілізації P2-Cy3. На жаль, подальше збільшення іонної сили не викликає подальшого підвищення ефективності іммобілізації. Щоб з'ясувати можливу причину такого результату провели спектрофотометричне дослідження впливу концентрації КН₂Р₄ на AuNPs. Рис. 4 показує, що при додаванні КН₂Р₄ до кінцевої концентрації 10 мМ до немодифікованих AuNPs їх спектр практично не змінюється, а от 20- і особливо 30-мілімолярна концентрація КН₂Р₄ викликають значне зменшення піку 520 нм характерного для одиничних (неагрегованих) наночастинок і появу ясно вираженого "плеча" в діапазоні 600-800 нм, що свідчить про зближення наночастинок і початок процесу їх агрегації. Зрозуміло, що агрегація AuNPs не може сприяти доступу олігонуклеотидів до поверхні наночастинок, що і позначається на ефективності їх іммобілізації при підвищенні концентрації КН₂Р₄ вище 15-20 мМ.



(А)



(Б)

Рис. 3. Залежність рівня флуоресценції вихідних розчинів P2-Cy3 (10 нМ P2-Cy3) і супернатантів, отриманих при центрифугуванні сумішей такої ж кінцевої концентрації P2-Cy3 з 3,25 нМ AuNPs після інкубації цих сумішей протягом 1 години при кімнатній температурі, від концентрації KH_2PO_4 (рН 4) (А); залежність ефективності іммобілізації від концентрації KH_2PO_4 (Б).

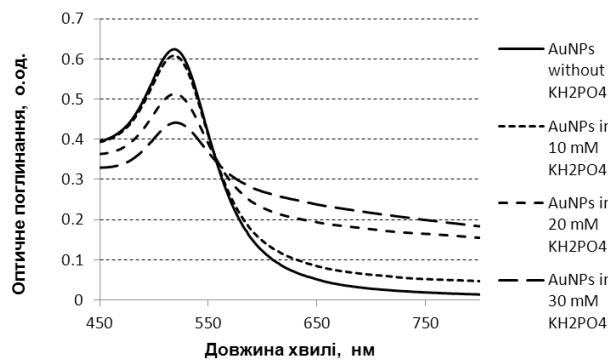
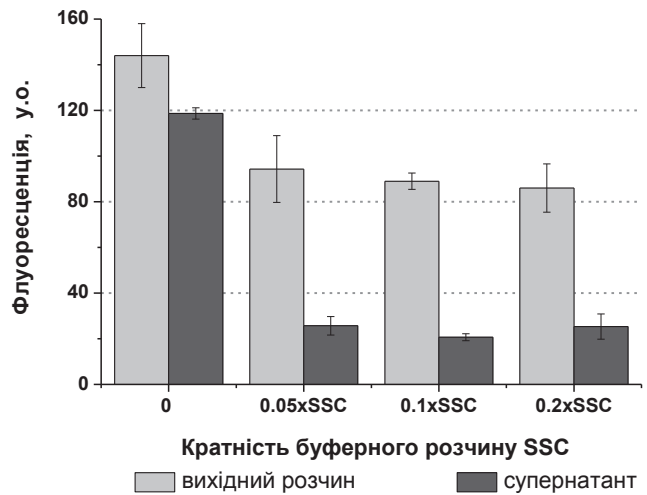


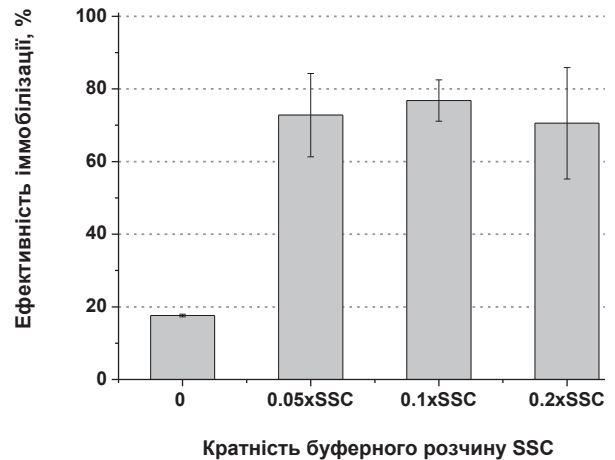
Рис. 4. Спектри поглинання немодифікованих, стабілізованих цитрат-іонами AuNPs у воді та при додаванні KH_2PO_4 .

Подібні результати були отримані і при використанні цитратного сольового буферного розчину (рН 7,2) (Рис. 5) та карбонатного буферного розчину (рН 9,5) (Рис. 6). Враховуючи те, що однократний цитратний сольовий буферний розчин ($1 \times \text{SSC}$) містить 15 мМ цитрату натрію та 150 мМ NaCl, можна стверджувати, що оптимум ефективності іммобілізації P2-Cy3 на поверхні AuNPs спостерігається при концентрації іонів на рівні 15-20 мМ незалежно від виду буферного розчину

та величини рН. Наявність цього оптимуму в усіх трьох випадках обумовлена тим, що спочатку збільшення іонної сили до 15-20 мМ позитивно впливає на рівень іммобілізації олігонуклеотидів, а потім при більш високій іонній силі починається процес агрегації AuNPs, і подальше підвищення рівня іммобілізації стає неможливим.



(А)



(Б)

Рис. 5. Залежність рівня флуоресценції вихідних розчинів P2-Cy3 (10 нМ P2-Cy3) і супернатантів, отриманих при центрифугуванні сумішей такої ж кінцевої концентрації P2-Cy3 з 3,25 нМ AuNPs після інкубації цих сумішей протягом 1 години при кімнатній температурі, від кратності цитратного сольового буферного розчину (рН 7,2) (А); залежність ефективності іммобілізації від концентрації цитратного буферного розчину (Б).

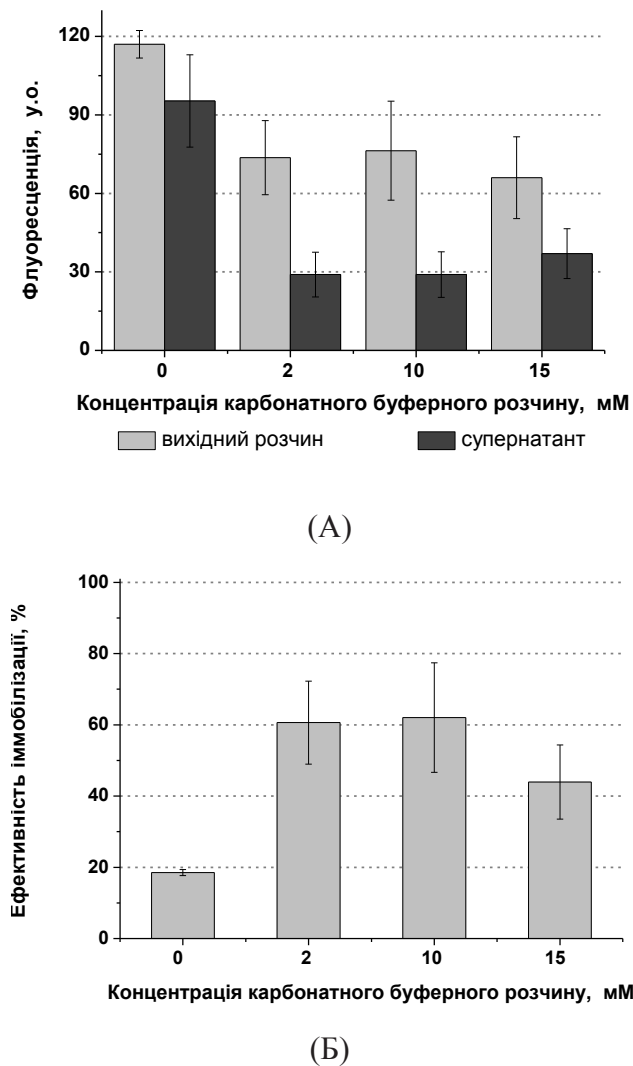


Рис. 6. Залежність рівня флуоресценції вихідних розчинів P2-Cu3 (10 нМ P2-Cu3) і супернатантів, отриманих при центрифугуванні сумішей такої ж кінцевої концентрації P2-Cu3 з 3,25 нМ AuNPs після інкубації цих сумішей протягом 1 години при кімнатній температурі, від концентрації карбонатного буферного розчину (рН 9,5) (А); залежність ефективності іммобілізації від концентрації карбонатного буферного розчину (Б).

Той факт, що не спостерігалось явного впливу величини рН середовища, можливо, пояснюється доволі низькою концентрацією P2-Cu3. Розрахунки показують, що поверхнева густина іммобілізації при цьому приблизно дорівнювала 1 молекулі олігонуклеотида на 150–250 нм² поверхні AuNPs. За таких обставин електростатичні взаємодії між молекулами олігонуклеотидів не можуть відігравати значної ролі.

Порівняння впливу різних буферних розчинів приводить до висновку про в цілому дуже близькі величини ефективності іммобілізації P2-Cu3 (з урахуванням величин стандартного відхилення від середнього значення) при використанні будь-якого з трьох середовищ. Найбільша ж середня величина ефективності іммобілізації P2-Cu3 на поверхні AuNPs була досягнута при використанні 0,1×SSC.

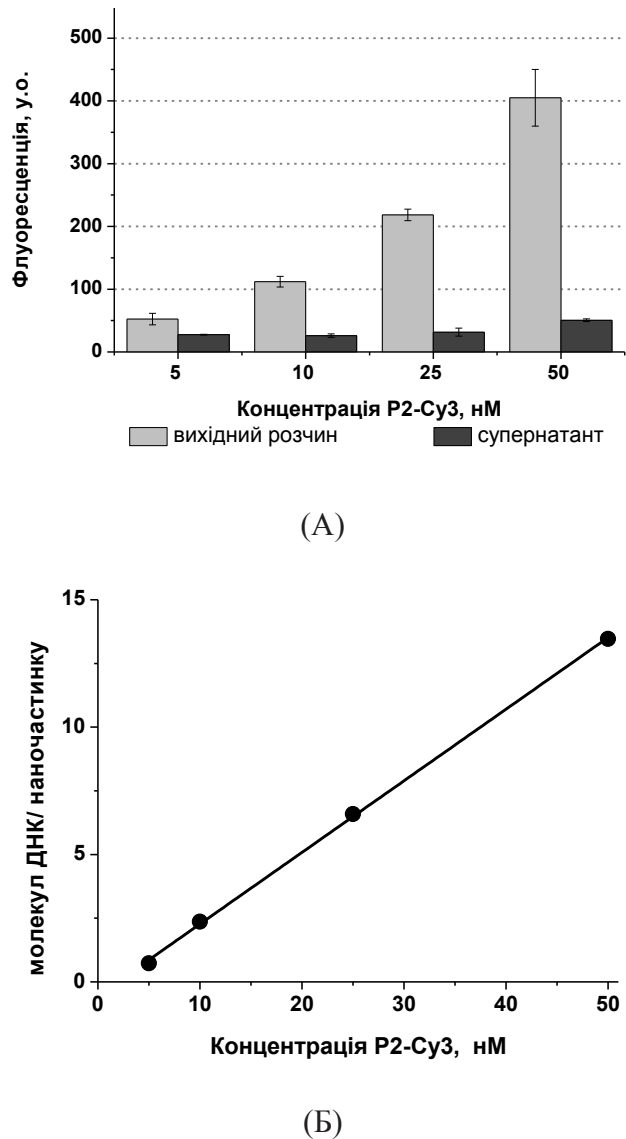
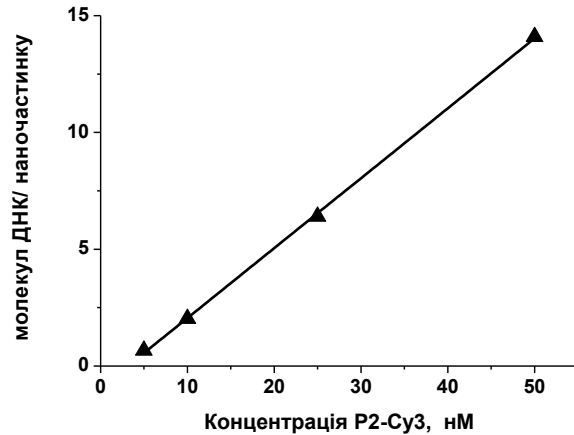


Рис. 7. Залежність рівня флуоресценції вихідних розчинів P2-Cu3 і супернатантів, отриманих при центрифугуванні сумішей відповідних концентрацій олігонуклеотидів з 3,25 нМ AuNPs після інкубації цих сумішей протягом 1 години в 0,1×SSC при кімнатній температурі, від концентрації P2-Cu3 (А); залежність поверхневої густини іммобілізації P2-Cu3 від їх концентрації (Б).

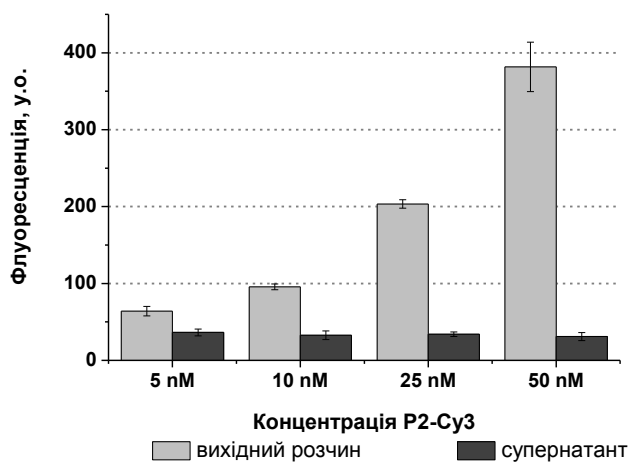
Тому саме $0,1 \times \text{SSC}$ був обраний як середовище для дослідження залежності поверхневої густини іммобілізації P2-Cu3 від концентрації олігонуклеотидів при інкубації протягом 1 години при кімнатній температурі. Як видно на рис. 7Б, дана залежність має лінійний характер в діапазоні 5–50 нМ. Величина поверхневої густини при 50 нМ P2-Cu3 досягає приблизно 13,5 молекул на одну наночастинку або 1 іммобілізовану молекулу на 40 нм^2 .

Проведення такого ж дослідження у воді, як можна було очікувати, показало значно нижчий рівень іммобілізації. Поверхнева густина при 50 нМ P2-Cu3 не досягає навіть величини 3 молекул на одну наночастинку, тобто на 1 іммобілізовану молекулу припадає 200 нм^2 . Збільшення часу інкубації олігонуклеотидів з AuNPs у воді при кімнатній температурі до 20 годин призводить до суттєвого поліпшення досліджуваного показника (Рис. 8). Залежність поверхневої густини іммобілізації P2-Cu3 від концентрації олігонуклеотидів при інкубації у воді протягом 20 години при кімнатній температурі, також має лінійний характер в діапазоні 5–50 нМ. Величина поверхневої густини при 50 нМ P2-Cu3 досягає приблизно 14 молекул на одну наночастинку або 1 молекулу на 38 нм^2 . Ця величина майже співпадає з тою, що отримана після інкубації протягом 1 години в $0,1 \times \text{SSC}$.



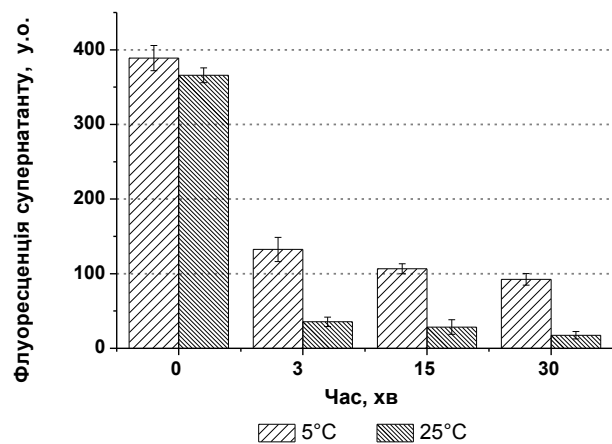
(Б)

Рис. 8. Залежність рівня флуоресценції вихідних розчинів P2-Cu3 і супернатантів, отриманих при центрифугуванні сумішей відповідних концентрацій олігонуклеотидів з $3,25 \text{ нМ AuNPs}$ після інкубації цих сумішей протягом 20 годин у воді при кімнатній температурі, від концентрації P2-Cu3 (А); залежність поверхневої густини іммобілізації P2-Cu3 від їх концентрації при інкубації протягом 20 годин у воді при кімнатній температурі (Б).

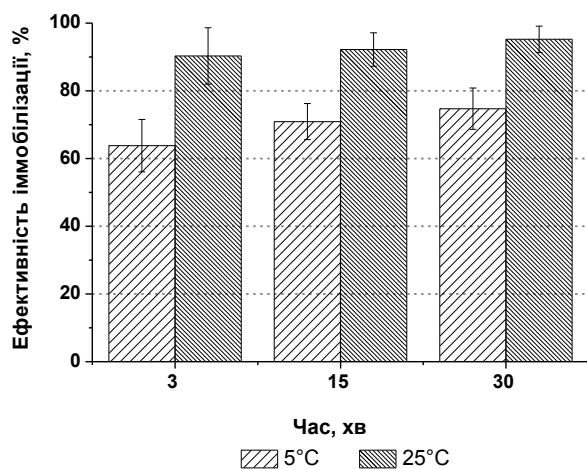


(А)

Ще одним фактором, що може впливати на ефективність іммобілізації P2-Cu3 на поверхні AuNPs є температура. Дійсно, якщо інкубація суміші 50 нМ P2-Cu3 та $3,25 \text{ нМ AuNPs}$ в $0,1 \times \text{SSC}$ буферному розчині при 5°C показує відносно повільну кінетику іммобілізації, то той же процес при кімнатній температурі відбувається так швидко, що всього за кілька хвилин ефективність іммобілізації P2-Cu3 досягає понад 90% (Рис. 9).



(А)



(Б)

Рис. 9. Залежність рівня флуоресценції супернатантів, отриманих при центрифугуванні сумішей 50 нМ P2-Cu3 з 3,25 нМ AuNPs після інкубації цих сумішей в $0,1 \times \text{SSC}$, від температури і часу інкубації (А); залежності ефективності іммобілізації P2-Cu3 від температури і часу інкубації (Б).

Таким чином, можна констатувати, що запропонований експериментальний підхід дозволяє визначати рівень іммобілізації олігонуклеотидів на поверхні наночастинок золота та досліджувати, як різні умови впливають на процес іммобілізації. Наші дослідження показали, що ефективність іммобілізації олігонуклеотидів на поверхні AuNPs, стабілізованих цитрат-іонами, сильно залежить від іонної сили середовища і суттєво залежить від температури та часу іммобілізації. В той же час склад буферного розчину та його рН практично не впливали на процес іммобілізації олігонуклеотидів (принаймні в досліджуваному діапазоні їх концентрацій). Вихідні (немодифіковані) AuNPs при концентрації KH_2PO_4 вище 20 мМ демонструють схильність до агрегації. Тому початкове підвищення іонної сили середовища (від 0 до 15-20 мМ) викликає підвищення ефективності іммобілізації олігонуклеотидів, а подальше підвищення іонної сили супроводжується процесом агрегації наночастинок, що, очевидно, перешкоджає подальшій ефективній іммобілізації олігонуклеотидів. Щоб уникнути впливу процесу агрегації AuNPs, можна проводити іммобілізацію олігонуклеотидів у водному середовищі. При

цьому (для відносно невисоких концентрацій олігонуклеотидів) можна досягти зрівняні величини поверхневої густини іммобілізації P2-Cu3, використовуючи більший період інкубації. З іншого боку, AuNPs модифіковані олігонуклеотидами мають бути більш агрегаційно стабільними, що можна використовувати за потреби для досягнення високої поверхневої густини олігонуклеотидів.

Список використаної літератури

1. Thaxton C.S., Georganopoulou D.G., Mirkin C.A. Gold nanoparticle probes for the detection of nucleic acid targets. // *Clin. Chim. Acta.* - 2006. - Vol. 363, № 1-2. - P. 120–126.
2. Caruthers S.D., Wickline S. a, Lanza G.M. Nanotechnological applications in medicine. // *Curr. Opin. Biotechnol.* - 2007. - Vol. 18, № 1. - P. 26–30.
3. Jain K.K. Applications of nanobiotechnology in clinical diagnostics. // *Clin. Chem.* - 2007. - Vol. 53, № 11. - P. 2002–2009.
4. Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander Elst L., and Muller R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. // *Chem. Rev.* - 2008. - Vol. 108, № 6. - P. 2064–2110.
5. Baptista P., Pereira E., Eaton P., Doria G., Miranda A., Gomes I., Quaresma P., Franco R. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2008. - Vol. 391, № 3. - P. 943–950.
6. Katz E., Willner I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* - 2004. - Vol. 43, № 45. - P. 6042–6108.
7. Jain P. K., Lee K. S., El-Sayed I. H., El-Sayed M. A. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. // *J. Phys. Chem. B.* - 2006. - Vol. 110, № 14. - P. 7238–7248.

8. Xiao Q., Gao H., Lu C., Yuan Q. Gold nanoparticle-based optical probes for sensing aminothiols // *TrAC Trends Anal. Chem.* - 2012. - Vol. 40. - P. 64–76.
9. Agasti S.S., Rana S., Park M.-H., Kim C.K. Nanoparticles for detection and diagnosis. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* Elsevier B.V., - 2010. - Vol. 62, № 3. - P. 316–328.
10. Yu L., Andriola A. Quantitative gold nanoparticle analysis methods: A review. // *Talanta.* Elsevier B.V., - 2010. - Vol. 82, № 3.- P. 869–875.
11. Li H., Rothberg L.J. Label-Free Colorimetric Detection of Specific Sequences in Genomic DNA Amplified by the Polymerase Chain Reaction// *J. Am. Chem. Soc.* - 2004, - 126, 10958-10961.
12. Pérez-López B., Merkoçi A. Nanoparticles for the development of improved (bio)sensing systems. // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2011. - Vol. 399, № 4. - P. 1577–1590.
13. Elghanian R., Storhoff J.J., Mucic R.C., Letsinger R.L., Mirkin C.A. Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles // *Science.* - 1997. - Vol. 277, № 5329. - P. 1078–1081.
14. Rosi N.L., Mirkin C.A. Nanostructures in biodiagnostics. // *Chem. Rev.* - 2005. - Vol. 105, № 4. - P. 1547–1562.
15. Park S.Y., Lytton-Jean A.K.R., Lee B., Weigand S., Schats G.C, Mirkin C.A. DNA-programmable nanoparticle crystallization. // *Nature.* - 2008. - Vol. 451, № 7178. - P. 553–556.
16. Hartwich G., Caruana D.J., Lumley-Woodyear T., Wu Y., Campbell C.N., Heller A. Electrochemical Study of Electron Transport through Thin DNA Films // *J. Am. Chem. Soc.* - 1999. - P. 10803–10812.
17. Herne T.M., Tarlov M.J. Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces.// *J. Am. Chem. Soc.* - 1997. - Vol. 119, № 13. - P. 8916–8920.
18. Maxwell D.J., Taylor J.R., Nie S. Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules. // *J. Am. Chem. Soc.* -2002. - Vol. 124, № 32. - P. 9606–9612.
19. Merkoçi A. Nanoparticles-based strategies for DNA, protein and cell sensors. // *Biosens. Bioelectron.* - 2010. - 26, № 4. 1164–1177.
20. Demers L.M., Mirkin C.A., Mucic R.C., Reynolds R.A., Letsinger R.L., Elghanian R., Viswanadham G. A fluorescence-based method for determining the surface coverage and hybridization efficiency of thiol-capped oligonucleotides bound to gold thin films and nanoparticles. // *Anal. Chem.* - 2000, - 72, № 22, 5535–5541.
21. O’Sullivan D.M., McHugh T.D., Gillespie S.H. Analysis of *rpoB* and *pncA* mutations in the published literature: an insight into the role of oxidative stress in *Mycobacterium tuberculosis* evolution? // *J. Antimicrob. Chemother.* - 2005. - Vol. 55, № 5.- P. 674–679.
22. Heifets L.B., Cangelosi G.A. Rapid drug-susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis*. // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* -1999. - Vol. 3, № 7. - P. 564–581.
23. Turkevitch J., Stevenson P.C., Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. // *Discuss. Faraday Soc.* - 1951. - Vol. 55, - P. 55–75.
24. Dios A.S., Diaz-Garcia M.E. Multifunctional nanoparticles: analytical prospects. // *Anal. Chim. Acta.* - 2010. - Vol. 666, № 1-2. - P. 1–22.
25. Chegel V., Rachkov O., Lopatynskiy A., Ishihara S., Yanchuk I., Nemoto Y., Hill J.P., Ariga K. Gold Nanoparticles Aggregation: Drastic Effect of Cooperative Functionalities in a Single Molecular Conjugate. // *J. Phys. Chem. C* - 2012. - Vol. 116, № 4. - P. 2683–2690.

Стаття надійшла до редакції 25.07.14