

К. М. МУЗИКА, канд. техн. наук, , с.н.с., ХНУРЕ, Харків

«ШТУЧНІ РЕЦЕПТОРИ» НА БАЗІ ТЕХНОЛОГІЇ МОЛЕКУЛЯРНОГО ІМПРИНТИНГУ В УМОВАХ ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУ

Досліджено молекулярну взаємодію «штучних рецепторів» з мелаїном в умовах поверхневого плазмонного резонансу. На основі отриманих ППР-даних показано, що технологія синтезу молекулярно імпринтованих полімерів на твердій фазі (скляних кульках) дає змогу створити «штучні рецептори» у вигляді МПП-наночасток, які можуть бути дешевою альтернативою антитілам. Найміцніші комплекси у даному випадку стали можливими завдяки особливості просторової будови молекули АМПК, в якій фосфатна та карбонільні групи розташовані таким чином, що є можливість без стеричних перешкод утворювати водневі зв'язки з функціональними групами молекули мелаїну.

Ключові слова: технологія молекулярного імпринтингу, штучні рецептори, поверхневий плазмонний резонанс, наночастки, молекулярна взаємодія.

Вступ. Розробка нових технологічних процесів виробництва приладів електронної техніки, зокрема, нових сенсорних пристроїв з високою точністю, селективністю, чутливістю, швидкодією, надійністю визначення складу речовин у різноманітних об'єктах є важливим завданням приладобудування. Зокрема, використання в сучасних сенсорах біотехнологій на базі антитіл, ферментів, нуклеїнових кислот, як правило забезпечує задовільні аналітичні характеристики і селективність сенсорів, проте проблемою є їх дорожнеча, особливо біосенсорів. При використанні біологічно активних речовин в якості рецепторів актуальною є також проблема підвищення часу функціонування сенсорів на їх основі. Використання технології, відомої як молекулярний імпринтинг, здатне вирішити або знизити гостроту озвучених вище проблем, шляхом створення так званих «штучних рецепторів», на базі молекулярно імпринтованих полімерів» (МППів) [1].

Вперше про явище молекулярного імпринтингу було повідомлено вченим з УРСР, Поляковим, у 1931 р. [2]. Інтерес до застосування технології молекулярного імпринтингу у сенсорах виник наприкінці 90-х років ХХ сторіччя (див. огляд [3]) і активно прогресує і дотепер. Так, за останні роки МППи все більше використовуються у сенсорному аналізі, який безпосередньо межує з псевдоімуноаналізом [4]. Псевдоімуноаналіз є більш дешевою альтернативою імунохімічним методам аналізу. Однак, незважаючи на деякий прогрес у даній області, шлях до створення "штучних рецепторів" – аналогів антитіл – залишається складним і довгим. Для успішного використання "штучних рецепторів" у хімічних сенсорах, необхідними умовами для досягнення високої селективності аналізу є:

- ліганд-селективність "штучних рецепторів" до речовин, які будуть визначатись. Ця характеристика пов'язана з технологією створення МППів;
- чутливий спосіб визначення акту молекулярної взаємодії.

Зазвичай для виявлення комплексу, що утворився, зазвичай в один з компонентів реакційної системи вводиться мітка. Найбільш поширеними є ферментні, флуоресцентні і радіонуклідні мітки і, відповідно, методи аналізу на їх основі [5]. Одним із перспективних шляхів виявлення ліганд-рецепторної взаємодії «штучний рецептор»-аналіт, а, отже, і розробки експрес виявлення різноманітних речовин можливий з використанням оптоелектронних перетворювачів, зокрема, які базуються на ефекті поверхневого плазмонного резонансу (ППР) (surface plasmon resonance, SPR). Сенсори на основі ППР або скорочено "ППР сенсори" – це відносно новий клас сенсорів на відміну від спектрофотометричних і люмінесцентних сенсорів [6]. Основні переваги використання таких систем перед традиційними методами обумовлені можливістю безпосереднього вивчення міжмолекулярних взаємодій і аналізу кінетичних параметрів зв'язування, що дозволяє виявити механізм такого процесу, а також відсутністю необхідності використання дороговартісних міток.

Сутність явища ППР умови його спостереження. ППР, полягає в зміні кута мінімальної інтенсивності відбитого плоскополяризованого світла в результаті процесів адсорбції-десорбції молекул на поверхні металевої плівки (рис.1). Поверхневі плазмони – це хвилі змінної щільності електричного заряду, які можуть виникати і поширюватися в електронній плазмі металу уздовж його поверхні або вздовж тонкої металевої плівки. Виявилось, що за певних умов поверхневі плазмони можуть збуджуватися під впливом поляризованого світла. У 1968 р це було про демонстровано в роботі [7]. Схема спостереження ППР, яку стали називати за прізвищем автора "геометрією Кречмана", показана на рис. 1.

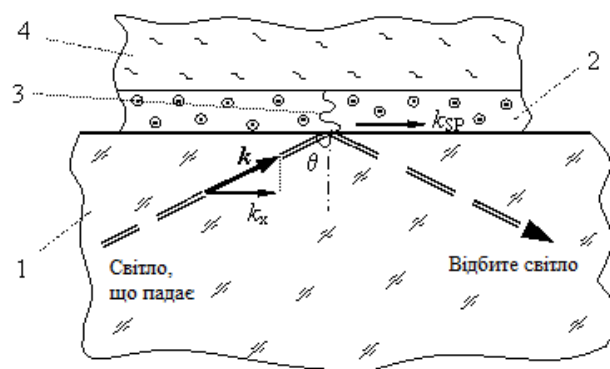


Рис. 1 – Схема оптичного спостереження явища ППР

Світло проходить крізь оптично прозоре середовище 1 з відносно великим показником заломлення,

наприклад, крізь призму зі скла і падає під певним кутом на тонку металеву плівку 2, нанесену на поверхню скла. Кут падіння повинен бути більшим кута повного внутрішнього відображення. Частина світла проникає в метал і поширюється в ньому у вигляді швидко загасаючої електромагнітної хвилі 3. Остання збуджує коливання вільних електронів металу - т.зв. "електронної плазми". У цій плазмі можуть виникати колективні коливальні рухи електронів, які прийнято описувати як квазічастинки - т.зв. "поверхневі плазмони".

Якщо металева плівка 2 досить тонка (<200 нм), то значна частина загасаючої в металі електромагнітної хвилі досягає протилежної поверхні металу. Тоді ППР стає чутливим до властивостей того середовища 4, яке контактує з металом з іншого боку плівки. Імпульс плазмона залежить від процесів, що протікають на поверхні плівки, наприклад адсорбції на ньому різних біомолекул. Імпульс фотона в свою чергу залежить від кута падіння і його енергії, тобто довжини хвилі. У 80-х роках ХХ ст. з'ясувалося, що ППР може стати і чутливим методом виявлення присутності навіть незначної кількості різних біологічних домішок. Для цього на зов-

нішній поверхні тонкої золотої плівки біохімічними методами висаджують ("імобілізують") мономолекулярний шар "ліганда" або "рецептора". Це шар органічних молекул, які вибірково взаємодіють з "аналітом" – тими молекулами (частками), концентрацію яких в розчині ми хочемо вимірювати. Коли молекули (частки) аналіту приєднуються до молекул ліганда (рецептора), створюване останніми електричне поле на поверхні металу дещо змінюється, внаслідок чого резонансний мінімум ППР зміщується. Цей зсув тим більший, чим більше молекул (частинок) аналіту приєдналося до біочутливого шару ліганда. Таким чином, змінюючи величину зсуву мінімуму кривої ППР, у принципі, стало можливим виявляти присутність і вимірювати концентрацію в розчинах багатьох важливих біохімічних речовин і мікрочастинок (вірусів, бактерій, антитіл, ...). А знімаючи залежність величини зсуву від часу, можна вивчити кінетику їх біохімічних взаємодій і її залежність від різних факторів.

Мета роботи. Метою роботи є дослідження молекулярної взаємодії «штучний рецептор» - меламін в умовах поверхневого плазмонного резонансу за для оцінки адекватності технології твердофазного синтезу МПП-наночасток, як альтернативи антитілам.

Методика експериментів. У попередніх роботах [8-9] з використанням методу теорії функціонала густини на рівні теорії $RwB97XD/6-31G(d)$ нами було показано, що серед 13 розглянутих функціональних мономерів, акриламід-2-метил-1-пропансульфонова кислота (АМПК) утворює найбільш енергетично вигідний комплекс з меламіном. Крім того, дана кислота формує найміцніші комплекси з меламіном, навіть, у порівнянні з атразином, який належать до того ж хімічного класу. Тому, у даній роботі в якості функціонального мономеру вибрана (АМПК), а в якості шаблону – меламін та атразин, як його структурний аналог.

Матеріали для підготовки твердої фази: скляні кульки (75 мкм, Sigma-Aldrich), NaOH, толуол, ацетон, глутаровий альдегід, фосфатно-сольовий буфер (рН 7.2), бідистилят, меламін.

Передполімеризаційна суміш: акриламід-2-метил-1-пропансульфонова кислота (Aldrich), атразин (Aldrich), етиленгліколь метакрилат фосфат (Aldrich), триметілолпропантриметакрилат (Aldrich), моногідрат 2-морфоліноетансульфонової кислоти (Fluka), диметилформамід.

Передполімеризаційна суміш заливалась у ємності з підготовленою твердою фазою (скляними кульками), повністю покриваючи її [10]. Після чого ємності розміщувалась в УФ камері. Час УФ-полімеризації тривав 1,5 хв. Потім полімеризаційна суміш промивалась холодними (4 С) розчинниками (ДМФ, ДМФ+ацетонітрил) з метою вимивання низько афінних фракцій полімеру. Для отримання високо афінних фракцій полімеру – МПП-наночасток, остання промивка полімеризаційної суміші здійснювалась за високої температури (60 С) ацетонітрилом.

Об'єм 10 мл з розчином наночасток у ацетонітрилі був сконцентрований до 2 мл. Після чого з використанням спеціального картриджу з мембранним фільтром (Amicon Centriplus®, 30 кDa, Millipore, UK) і центрифуги МПП-наночастки були промиті водним розчином.

Імобілізація МПП-наночасток на поверхні золотого мікрочипу

Реактиви: 2- [морфоліно] етансульфоновою кислотою (МЕК) (буфер), 1-етил-3-[3-диметиламінопропіл] карбодіімід (EDC (Product No. 22980)).

Чип з золотим шаром (SIA Kit Au, Biacore) був оброблений шляхом занурення у розчин (H_2SO_4/H_2O_2 , 3:1) на 5 хв, ретельно промитий двічі дистильованою водою і залишений в етанолі на ніч. Іммобілізація шаблону проводилась шляхом інкубації чипу у розчині цистеаміну (0.2 мг/мл) за 4 °C протягом 12 год, з подальшим промиванням етанолом і інкубацією протягом 45 хв у 7% розчині глутаральдегіду у фосфатному буфері (рН 7.2). Після чого МПП-наночастки змішувались з EDC за протоколом Thermo Scientific NHS і сульфо-NHS.

У присутності карбодіімідів, зокрема EDC (продукт No. 22980), отримуються NHS або сульфо-NHS складні ефіри, які потім можуть реагувати з первинними амінами ($-NH_2$) з утворенням амідних зв'язків (рис. 2).

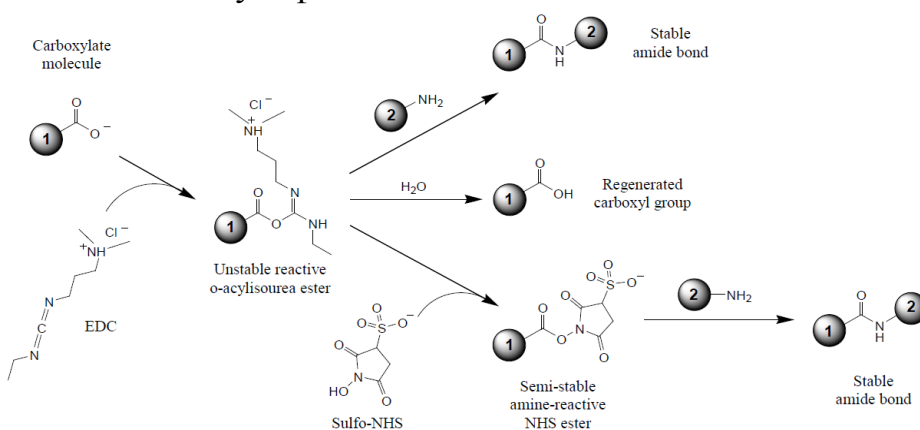


Рис. 2 – Схема хімічної реакції за протоколом Thermo Scientific NHS і сульфо-NHS

NHS-активовані молекули використовуються для оперативної реакції з аміногрупами, що містяться на ефект-роді, таким чином, забезпечуючи іммобілізацію.



Рис. 3 – Фотографія мікрофлюїдного картриджу, що інтегровано у прилад Biacore 3000

ППР-дослідження.

ППР-дослідження проводились у мікрофлюїдній системі (рис. 3), яка представляла собою спеціальну мікропроточну комірку, мікроканали якої знаходяться в безпосередньому фізичному контакті з золотим чипом, на якому був іммобілізований шар МПП-наночасток.

У першій фазі вимірювань проточна комірка і чутлива поверхня спочатку промиваються кілька хвилин буферним розчином. Потім (у другій фазі) через комірку (зі швидкістю потоку 35 мкл /хв за температури 25 °C) прокачувався дослідний зразок (об'ємом 100 мкл) рідини з досліджуваним аналітом (меламіном), і проводилось вимірювання. Швидкість потоку підтримувалась однаковою і забезпечувала мінімальну дисперсію зони зразка. Меламін приєднувався до ліганду (шару з МПП-наночастками) не відразу. Тому криву ППР доводилося вимірювати багато разів, кожен раз розраховуючи за результатами вимірювань точне положення мінімуму ППР, і будувати графік його залежності від часу («сенсограму»). В ході наступної (третьої) фази інжекція аналіту припинялась, проте прокачування чистої рідини (буферного розчину) продовжувалось. При цьому процеси приєднання теж практично припинялись, а проходили лише процеси дисоціації.

Хід кривої на цій стадії дозволив обчислити константи цього процесу, які становили ($K_d = 8.7 \times 10^{-8} \pm 1.5 \times 10^{-9}$ М).

У четвертій фазі через комірку прокачувався розчин елюенту, тобто рідини, яка різко послаблювала хімічний зв'язок мелаїну з МПП-шаром, поступово "вимиваючи" мелаїн, і, практично не впливаючи на МПП-шар. Так відбувалась регенерація чутливої поверхні, в ході якої положення мінімуму ППР повинне було повернутися до початкового.

Після цього було почато новий цикл вимірювань хімічної взаємодії МПП-шару з мелаїном, але за іншої концентрації. Так було проведено шість досліджень взаємодії мелаїну з МПП-шаром, але за різних концентрацій мелаїну (4 нМ, 0.064 нМ, 0.032 нМ, 0.16 нМ, 0.8 нМ, 20 нМ). За даними сенсора прилад Biacore 3000 у режимі реального часу будував криву взаємодії досліджуваного зразка з сенсорним чіпом – сенсограму. За допомогою BIAEvaluation Software v4.1 (Biacore, Sweden) було отримано кінетичні параметри комплексоутворення, які аналізувались із застосуванням моделі (1:1) Ленгмюра, з метою визначення різних параметрів реакції (константи дисоціації / асоціації, концентрації досліджуваної речовини тощо.)

Обговорення результатів експериментальних досліджень. Як видно з рис. 4, максимальну концентрацію іммобілізованого (тобто приєднаного до МПП-шару) мелаїну було досягнуто лише через кілька хвилин. Кінетика наростання зсуву мінімуму ППР відображає кінетику хімічних реакцій приєднання мелаїну до МПП-наночасток. Стаціонарний стан, який врешті-решт встановився, є результатом динамічної рівноваги між хімічними процесами приєднання і дисоціації мелаїну і залежить як від констант відповідних реакцій, так і від концентрації аналіту, температури розчину, умов перемішування тощо.

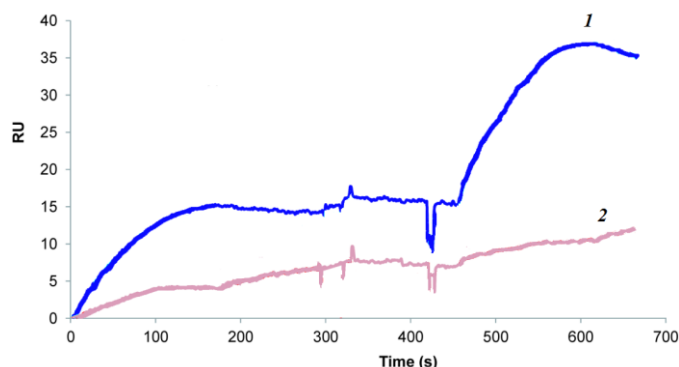


Рис. 4 – Сенсограма взаємодії анти-мелаїну МПП наночасток з мелаїном (1) та атразиним (2)

З рис. 4 видно, що синтезовані анти-мелаїни МПП-наночастки (з функціонального мономеру – АМПК) мають більшу афінність до мелаїну, ніж до атразину, який належить до того ж хімічного класу. Це корелюється з даними наших попередніх теоретичних досліджень [8-9], де вивчалась ліганд-селективність (т. з. псевдоімуноспецифічність) трьох функціональних мономерів АМПК по відношенню до молекули мелаїну та атразину. Крім того, результати молекулярної взаємодії анти-мелаїну МПП наночасток корелюють з результатами, отриманими за допомогою моноклональних антитіл, з подібними до мелаїну гаптенами [11].

Висновки. У ході проведених досліджень було отримано кінетичні криві молекулярної взаємодії «штучних МПП-рецепторів» з мелаїном. Коефіцієнт дисоціації становив ($K_d = 8.7 \times 10^{-8} \pm 1.5 \times 10^{-9}$ М). Таким чином, на основі технології синтезу МПП з використанням твердої фази з'явилась можливість отримати нанорозмірні «штучні МПП-рецептори», зокрема, на мелаїн, з афінністю, близькою до афінності антитіл.

Найміцніші комплекси у даному випадку стали можливими завдяки особливості просторової будови молекули АМПК, в якій фосфатна та карбонільні групи розташовані таким чином, що є можливість без стеричних перешкод утворювати водневі зв'язки з функціональними групами молекули меламіну.

Подяки. Автор висловлює подяку проф. Пілецькому (Лестерський університет, Велика Британія) за можливість використання обладнання для ППР – Віасоре 3000 (Віасоре, Швеція) та консультації під час проведення експерименту і при аналізі результатів.

Список літератури:**1.** *Muzyka, K., Piletsky, S. Rozhitskii, M.* Chap. 5 in Handbook of Molecularly Imprinted Polymers, Eds. C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, 2013. - P. 197-228.**2.** *Поляков, М. В.* Абсорбционные свойства силикагеля и его структура [Text] / *М. В. Поляков* // Журнал физической химии / Академия СССР. – 1931. – Т. 2. – С. 799-805.**3.** *Whitcombe, M. J.* Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years 2004-2011 [Text] / *M. J. Whitcombe, N. Kirsch, I. A. Nicholls* // J. of Mol. Rec. – 2014. – Vol. 27. – P. 297–401.**4.** *Moreno-Bondi, M. C.* Immuno-like assays and biomimetic microchips [Text] / *M. C. Moreno-Bondi, M. E. Benito-Peña, J. L. Urraca, G. Orellana* // Top Curr Chem. – 2012. – Vol. 325. – P. 111-164.**5.** *Muzyka, K.* (2014). Current Trends in the Development of the Electrochemiluminescent Immunosensors [Text] / *K. Muzyka* // Biosensors and Bioelectronics, – 2014 – Vol. 54. – P. 393–407. DOI: 10.1016/j.bios.2013.11.011.**6.** *Atar, N.* A molecular imprinted SPR biosensor for sensitive determination of citrinin in red yeast rice [Text] / *N. Atar, T. Eren, M.L. Yola* // Food Chemistry. – 2015 – Vol. 184. – P. 7-11.**7.** *Ritchie, R. H.* Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films [Text] / *R. H. Ritchie* // Physical Review. – 1957. – Vol. 106 (5). – P. 874–881. **8.** *Музыка, К. М.* Метод теорії функціонала густини у дослідженні псевдо-іммунологічної специфічності штучного рецептора на меламін [Текст] / *К. М. Музыка* // Східно-європейський журнал передових технологій. - 2014. – № 5(6). – С. 22-26.**9.** *Музыка, Е. Н.* "Теоретическое изучение энергетических характеристик "искусственного рецептора" на меламина в предполимеризационной фазе" [Текст] / *Е. Н. Музыка* // Журнал нано- та електронної фізики. - 2015 – Т. 7. – С. 1-5.**10.** *Muzyka, K.* Optimisation of the synthesis of vancomycin-selective molecularly imprinted polymer nanoparticles using automatic photoreator [Text] / *K. Muzyka, K. Karim, A. Guerreiro, A. Poma and S. Piletsky* // Nanoscale Research Letters. – 2014 – Vol. 9 (1). – P. 154-161.**11.** *Grant, S. D.* Rapid selection of anti-hapten antibodies isolated from synthetic and semi-synthetic antibody phage display libraries expressed in Escherichia coli [Text] / *S. D. Grant, A. J. Porter, W. J. Harris* // J. Agric. Food Chem. - 1998. – Vol. 47. – P. 340.

Bibliography (transliterated): **1.** *Muzyka, K., Piletsky, S. Rozhitskii M.* (2013). Chap. 5 in Handbook of Molecularly Imprinted Polymers, Eds. C. Alvarez-Lorenzo, A. Concheiro, 197-228.**2.** *Polyakov, M. V.* (1931). Adsorption properties and structure of silica gel SSSR., 2, 799-805.**3.** *Whitcombe, M. J.* (2014). Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years 2004-2011. J. of Mol. Rec., 27, 297–401.**4.** *Moreno-Bondi, M. C., Benito-Peña, M. E., Urraca, J. L., Orellana, G.* (2012). Immuno-like assays and biomimetic microchips. Top Curr Chem., 325, 111-164.**5.** *Muzyka, K.* (2014). Current Trends in the Development of the Electrochemiluminescent Immunosensors. Biosensors and Bioelectronics, 54, 393–407. DOI: 10.1016/j.bios.2013.11.011.**6.** *Atar, N., Eren, T., Yola, M. L.* (2015). A molecular imprinted SPR biosensor for sensitive determination of citrinin in red yeast rice. Food Chemistry, 184, 7-11.**7.** *Ritchie, R. H.* (1957). Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films. Physical Review, 106, 874–881. DOI:10.1103/PhysRev.106.874.**8.** *Muzyka, K.* (2014). The method of density functional theory in the study of pseudo-immunological specificity of the artificial receptor on melamine. Easten-European Journal of Enterprise Technologies, 5/6 (71), 22-26.**9.** *Muzyka, K.* (2015). Theoretical Study of Energy Characteristics of "Artificial Receptor" on Melamine in Pre-Polymerization Phase. Journal of Nano- and Electronic Physics, 7, 1-5.**10.** *Muzyka, K., Karim, K., Guerreiro, A., Poma, A., Piletsky S.* (2014). Optimisation of the synthesis of vancomycin-selective molecularly imprinted polymer nanoparticles using automatic photoreator. Nanoscale Research Letters, 9 (1), 154-161.**11.** *Grant, S. D., Porter, A. J., Harris, W. J.* (1998). Rapid selection of anti-hapten antibodies isolated from synthetic and semi-synthetic antibody phage display libraries expressed in Escherichia coli. J. Agric. Food Chem, 47, 340.

Надійшла (received) 21.04.2015