

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

СИНТЕЗ, ХАРАКТЕРИСТИКА И  
ФУНКЦИОНАЛИЗАЦИЯ ДНК-ЗОНДАМИ ЗОЛОТЫХ НАНОЧАСТИЦ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы  
направления подготовки 06.03.01 - Биология  
биологического факультета  
Кенжегулова Одиссея Альбертовича

Научный руководитель  
Заведующий кафедрой биохимии  
и биофизики д.б.н., профессор \_\_\_\_\_ С.А.Коннова

Научный консультант:  
канд. биол. наук, ученый  
секретарь ИБФРМ РАН .. \_\_\_\_\_ Т.Е.Пылаев

Заведующий кафедрой биохимии  
и биофизики д.б.н., профессор \_\_\_\_\_ С.А.Коннова

Саратов 2016 год

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность работы.** Последние несколько десятилетий, золотые наночастицы (ЗНЧ) были и остаются предметом интенсивных исследований. Функционализированные ЗНЧ с контролируемыми геометрическими параметрами и уникальными оптическими свойствами являются перспективными объектами для биомедицинских исследований, таких как, биосенсорика, иммуноанализ, клиническая лабораторная диагностика, лазерная фототерапия клеток злокачественной опухоли, адресная доставка лекарственных средств, ДНК-мишеней и вакцин, оптический биоимиджинг и мониторинг физиологического состояния клеток и тканей. ЗНЧ очень интересны, поскольку они обладают уникальными оптическими свойствами, связанными с наличием в спектрах рассеяния и поглощения одного или нескольких пиков плазмонного резонанса в видимой и ближней инфракрасных областях. Эти пики обусловлены так называемыми локализованными плазмонными резонансами. Несмотря на многочисленные достоинства, ЗНЧ склонны к солевой агрегации при высокой ионной силе раствора, что значительно ограничивает их применение без дополнительной стабилизации. Тем не менее, уникальные оптические свойства ЗНЧ, такие как биосовместимость с различными макромолекулами, доступные протоколы синтеза и возможность функционализации молекулярными зондами, позволяют создавать многофункциональные композитные наноматериалы на основе металлических наночастиц (НЧ) и широкого спектра биомолекул. В данной работе, объектом исследования являются ДНК-функционализированные ЗНЧ, что особенно актуально, поскольку биомолекулы ДНК особенно пригодны для применения в нанобиотехнологиях, в частности, в развитии инновационных методов ДНК-детекции. Растущий интерес к обнаружению ДНК связан с потребностью к созданию высокоспецифичных, чувствительных экспресс-анализов.

**Цель работы** – синтез, характеристика и функционализация ДНК-зондами золотых наночастиц, как основы для создания высокоспецифичных тест-систем.

Для реализации цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) синтезировать и охарактеризовать препарат ЗНЧ, полученный методом жидкофазного химического синтеза;
- 2) синтезировать и охарактеризовать ДНК-маркеры, полученные в результате присоединения тиол-модифицированных олигонуклеотидов к поверхности ЗНЧ.

**Материалы и методы исследования:** Объектом исследования служили ЗНЧ, функционализованные олигонуклеотидными зондами.

В работе использовались ЗНЧ сферической формы, размером 15 нм. Используемый олигонуклеотид для функционализации представляет собой 5'-3' последовательность из 33 нуклеотидов, имеющую следующий вид:

TrS-(SH-dT)ag - cag - gtg - cta - aaa - agg - tgt - tta - tta - ctg – ctc-c

Для достижения поставленной цели проводили синтез ЗНЧ, характеристику ЗНЧ с помощью UV-Vis-спектрофотометрии, определение морфологии ЗНЧ методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), определение среднего размера ЗНЧ методом динамического рассеяния света (ДРС), определение «золотого числа», синтез ДНК-функционализованных ЗНЧ, проведение горизонтального гель-электрофореза ДНК-функционализованных ЗНЧ.

**Структура бакалаврской работы:** работа состоит из введения, основной части, заключения, выводов и списка использованных источников. Обзор литературы составлен из 82 источников, в нем рассмотрены следующие вопросы: физико-химические свойства ЗНЧ; методы синтеза ЗНЧ; принципы ДНК-функционализации ЗНЧ; характеристика ДНК-функционализованных ЗНЧ; применение ДНК-функционализованных ЗНЧ.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

На первом этапе исследований был выполнен синтез ЗНЧ методом жидкофазного химического синтеза. Суть данного метода заключается в восстановлении золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК) цитратом натрия. В результате образуются частицы со средним диаметром 15 нм. Выбор метода Френса для синтеза обусловлен образованием наиболее устойчивых зольей золота. Цветовые переходы раствора частиц золота свидетельствовали о наличии нескольких стадий образования НЧ. Изначально, бледно-желтый раствор ЗХВК при добавлении восстановителя, становился бесцветным, что говорило о проведении химической реакции. Сначала образовывались зародыши частиц, и раствор приобретал фиолетовую окраску. Затем, по мере роста частиц, реакционная смесь меняла цвет, и через стадии фиолетовый-малиновый-темно-вишневый становилась винно-красной, как показано на рисунке 1, что свидетельствовало об окончании реакции.

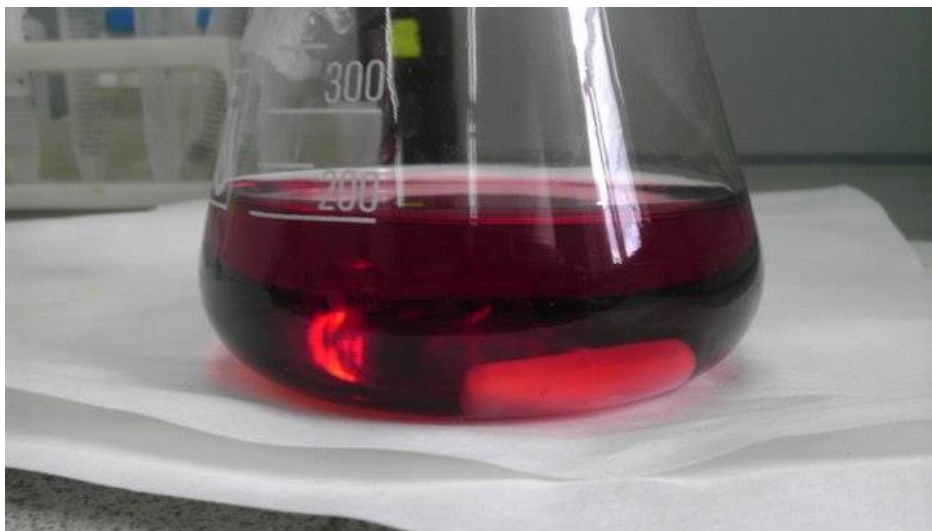


Рисунок 1 - Свежеприготовленный раствор 15-нм золотых наночастиц с характерным винно-красным цветом.

С целью контроля полученного продукта для синтезированных частиц проводили спектрофотометрические измерения в диапазоне длин волн 220-700 нм. Был получен спектр поглощения ЗНЧ, представленный на рисунке 2, на котором отмечается пик поглощения в области 520 нм, соответствующий пику плазмонного резонанса, характерного для золя золота со средним диаметром 15 нм. Темно-красный цвет полученного раствора золя отражает поверхностную плазмонную полосу. Из полученных результатов можно сделать вывод, что оптическая плотность может быть использована как мера эффективности НЧ, так как этот параметр зависит от размера частиц и показателя преломления.



Рисунок 2 - Спектр поглощения препарата золотых наночастиц с размером 15 нм.

Для определения морфологии ЗНЧ, синтезированных по методу Френса, проводили микроскопический анализ с помощью просвечивающего электронного микроскопа, результатом которого являются ТЭМ-изображения, представленные на рисунке 3. Исходя из полученных данных видно, что все частицы единообразны и имеют сферическую форму. Помимо этого отмечается, что частицы свободно находятся в растворе и не агрегируют. Для характеристики готового золя золота важным является средний размер частиц в растворе. Подобную оценку давали методом ДРС. По известным данным, существует зависимость размера частиц от их

процентной доли в растворе, представленная на рисунке 4. Распределение по размерам отражает дисперсность системы.

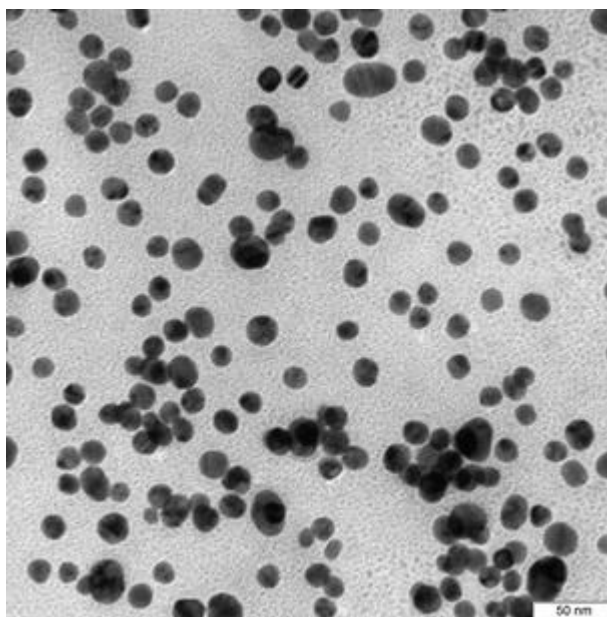


Рисунок 3 - Исследование формы и размера золотых наночастиц методом трансмиссионной электронной микроскопии.

В случае, когда кривая распределения имеет вид с четко оформленным пиком, т.е. частицы имеют почти одинаковый размер, говорят о монодисперсной системе. Исходя из данных, представленных на рисунке 4, можно сделать вывод, что полученные ЗНЧ являются монодисперсной системой со средним размером частиц 15 нм. Однако, данный анализ не заменяет спектрофотометрического контроля, а лишь дополняет его.

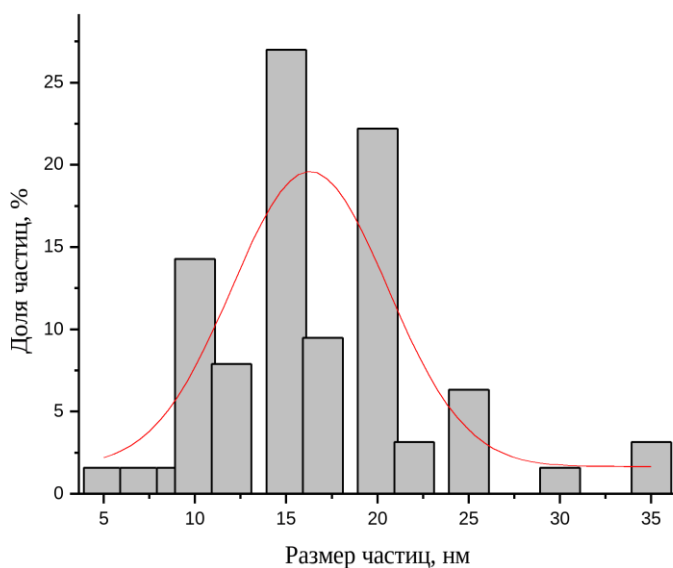
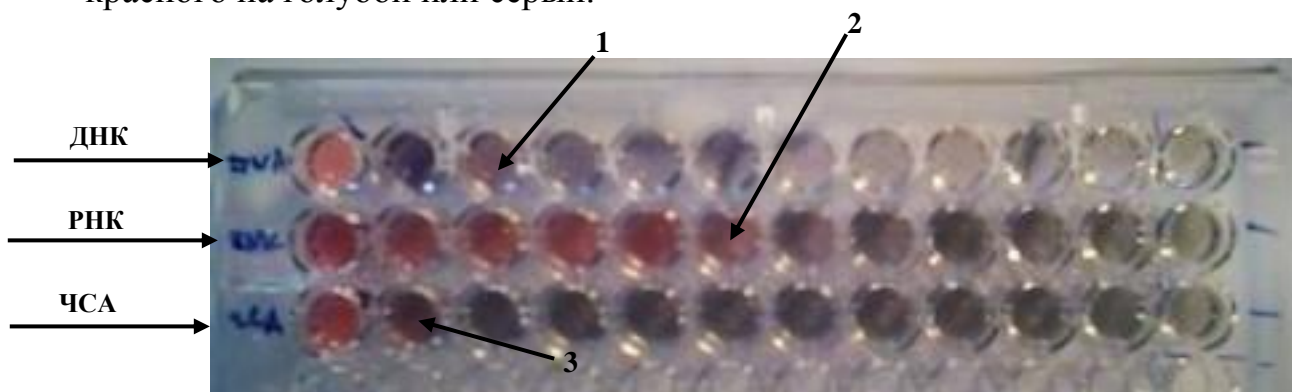


Рисунок 4 - Средний размер золотых наночастиц в растворе.

Для определения агрегативной устойчивости полученного золя золота проводили тест на «золотое число». Определяли минимальное защитное количество стабилизирующего вещества. В качестве стабилизирующих веществ для проведения данного теста использовали растворы ДНК, РНК, ЧСА. На рисунке 5 показано, что в тех лунках где условия инкубационной среды не были оптимальными по золотому числу, происходит агрегация после добавления NaCl, о чем свидетельствует изменение цвета золя с красного на голубой или серый.



1 - ДНК (125 мкг/мл), 2 - РНК (31,25 мкг/мл), 3 - человеческий сывороточный альбумин (250 мкг/мл).

Рисунок 5 - Значения минимальных количеств стабилизирующих веществ для 15-нм золотых наночастиц.

По ходу проведения теста на «золотое число» для 15-нм ЗНЧ были получены значения минимальных количеств стабилизирующих веществ, которые составили: 125 мкг/мл для ДНК; 31,25 мкг/мл для РНК; 250 мкг/мл для ЧСА.

Таким образом, с помощью вышеуказанных методов мы провели характеристику ЗНЧ. С помощью визуальной регистрации отметили характерный винно-красный цвет золя золота. С помощью спектрофотометрических измерений зафиксировали наличие пика поглощения при 520 нм, что подтверждает размер ЗНЧ, который составил 15 нм. Результаты ДРС свидетельствуют о монодисперсности полученного золя. Результаты ТЭМ показали сферическую форму ЗНЧ. Результаты теста «золотое число» дали информацию о агрегативной устойчивости частиц, необходимую для их дальнейшей функционализации.

На втором этапе работы проводили характеристику ДНК-маркеров, полученных путем ковалентной пришивки тиол-модифицированных олигонуклеотидов к поверхности ЗНЧ. Для синтеза конъюгатов был выбран хемосорбционный метод пришивки зондов через тиоловую группу. Выбор данного метода исходил из известных данных о высокой стабильности маркеров, полученных таким способом. Процедуру мечения ЗНЧ проводили следующим образом: раствор 15-нм ЗНЧ смешивали с олигонуклеотидом, предварительно очищенным и активированным от защитных групп, и инкубировали. Далее, ступенчато повышали ионную силу раствора, освобождались от избытка зондов и концентрировали олигонуклеотид. Для подтверждения пришивки олигонуклеотидов к поверхности ЗНЧ проводили спектрофотометрический контроль, позволяющий отследить изменения положения и амплитуды пиков поглощения по мере проведения функционализации. На рисунке 6 представлен спектр поглощения свободных 15-нм ЗНЧ и конъюгата. Для свободных 15-нм ЗНЧ отмечается характерный пик поглощения при длине волны 520 нм. Для конъюгата отмечается



сохранение пика при длине волны 520 нм и появление слабо выраженного пика при длине волны 260 нм, обусловленного наличием на поверхности ЗНЧ олигонуклеотидных зондов. Невысокая амплитуда пика при длине волны 260 нм обусловлена удалением путем центрифугирования раствора конъюгата несвязавшихся олигонуклеотидных зондов. Дополнительно проводили характеристику конъюгатов методом горизонтального агарозного гель-электрофореза. На рисунке 7 представлена электрофореграмма, позволяющая дать как качественную, так и количественную характеристику ДНК-функционализированным ЗНЧ. На электрофореграмме не детектируется свободные ЗНЧ и супернатант после неудачной попытки функционализации, что не противоречит прогнозируемым результатам.

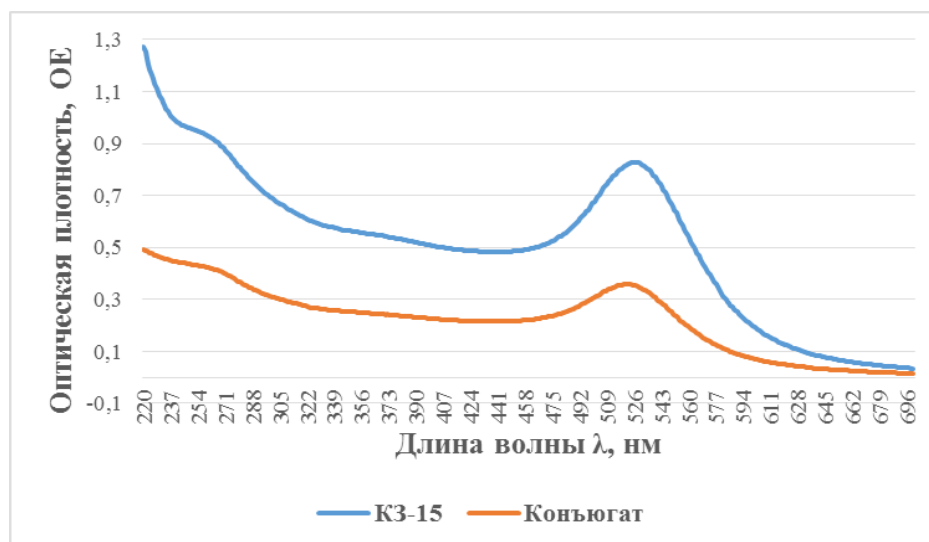
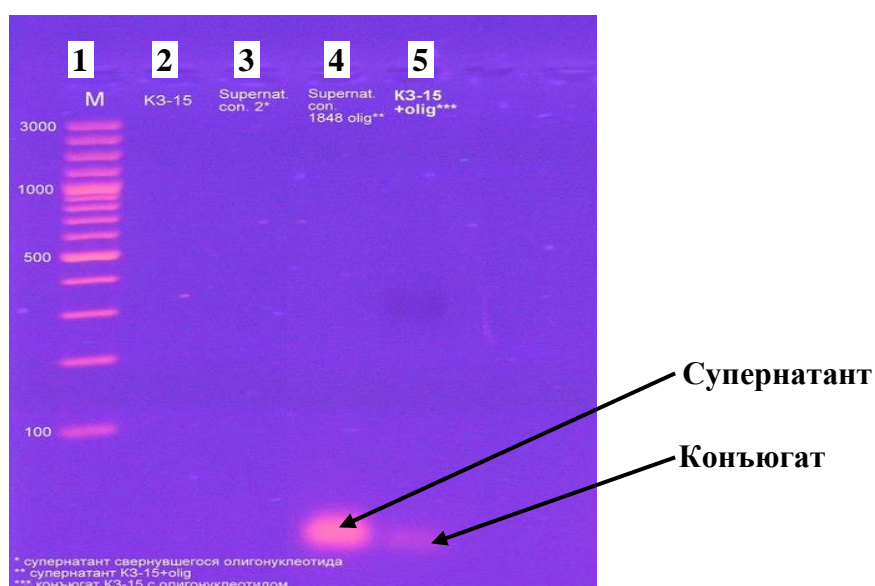


Рисунок 6 - Спектр поглощения 15-нм золотых наночастиц и конъюгата с олигонуклеотидными зондами.

Однако, на электрофореграмме отчетливо детектируется полученный конъюгат и его супернатант, содержащий не связавшиеся ДНК-зонды. Исходя из положения конъюгата и его супернатанта относительно маркеров молекулярного веса, делаем вывод о длине олигонуклеотидных последовательностей, которая составила менее 100 п.н. По интенсивности свечения конъюгата и его супернатанта, показано, что количество не связавшихся ДНК-зондов преобладает над количеством связавшихся, о чем также свидетельствует слабовыраженный пик поглощения конъюгата при

длине волны 260 нм, показанный на рисунке 6. Для полученного конъюгата также проводили измерения методом ТЭМ, представленные на рисунке 8, но результаты оказались идентичными, как в случае измерения свободных ЗНЧ. Это доказывает слабую информативность данного метода для характеристики конъюгатов.

Таким образом, с помощью вышеуказанных методов, мы провели характеристику полученного конъюгата. С помощью спектрофотометрических измерений зафиксировали сохранение пика поглощения при 520 нм и появление пика при 260 нм, что подтверждает положительный результат функционализации ЗНЧ.



**1** - M - маркер молекулярного веса, **2** - 15-нм золотые наночастицы, **3** - супернатант неудавшегося эксперимента, **4** - супернатант конъюгата, **5** - конъюгат.

Рисунок 7 - Электрофореграмма конъюгата и его супернатанта.

Результаты агарозного гель-электрофореза дали как качественную, так и количественную оценку конъюгату. Результаты ТЭМ показали сферическую форму функционализированных ЗНЧ, ничем не отличающуюся от свободных. Однако, отметим, что ДНК-функционализированные ЗНЧ не агрегируют, что говорит о стабильности полученного конъюгата.

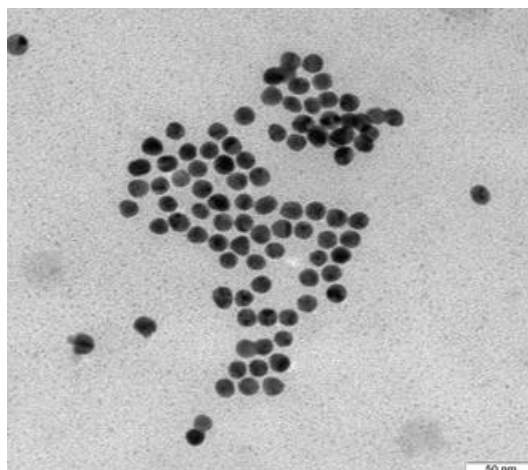


Рисунок 8 - Исследование формы и размера ДНК-функционализированных золотых наночастиц методом трансмиссионной электронной микроскопии.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние 10-15 лет ЗНЧ нашли разнообразное применение в нанобиотехнологии. Особое внимание уделяют созданию и применению биоспецифических маркеров-конъюгатов коллоидного золота, так как оно удовлетворяет всем требованиям к идеальному маркеру: легкая электронно-микроскопическая визуализация, заданный размер, форма и структура, стабильность, прочное связывание с биомолекулами без снижения их активности.

В данной работе мы синтезировали ЗНЧ по методу Френса, характеризовали их морфологию, стабильность и показатели поглощения с помощью методов визуального детектирования, спектрофотометрии, ТЭМ-микроскопии, ДРС и определения агрегативной устойчивости. Полученные результаты позволяют утверждать, что синтезированные ЗНЧ имеют сферическую форму со средним размером частиц 15 нм, пик плазмонного резонанса при длине волны 520 нм и показатели минимального содержания стабилизирующих веществ, таких как ДНК, РНК, ЧСА в количестве 125, 31,25 и 250 мкг/мл, соответственно. Эти данные позволяют рекомендовать полученные ЗНЧ для дальнейшей функционализации.

Исходя из того, что полученные ЗНЧ удовлетворяют всем необходимым требованиям для создания конъюгатов, мы провели синтез ДНК-маркеров, путем ковалентной пришивки тиол-модифицированных олигонуклеотидов к поверхности ЗНЧ и их характеристику методами спектрофотометрии, ТЭМ и горизонтального агарозного гель-электрофореза. Полученные данные ТЭМ показывают идентичную морфологию конъюгатов с свободными ЗНЧ. Результаты спектрофотометрии и горизонтального агарозного гель-электрофореза подтверждают положительный результат конъюгирования. Длительное сохранение розового цвета раствора ДНК-функционализированных ЗНЧ без изменения цвета на голубой или серый, подтверждает сохранение стабильности конъюгатов. Отмечаем, что синтезированный в данной работе маркер, представляет собой практическую значимость, поскольку является инструментом, который преобразует результаты биоспецифических взаимодействий в детектируемый оптический сигнал в устройствах, называемых биосенсорами.

## **ВЫВОДЫ**

1. Показано, что в результате синтеза по методу Френса получены золотые наночастицы со следующими характеристиками: сферическая форма, средний размер частиц 15 нм, пик плазмонного резонанса при длине волны равной 520 нм.

Установлено, что для стабилизации золя золотых наночастиц минимальные концентрации стабилизирующих веществ ДНК, РНК, человеческого сывороточного альбумина составляют 125; 31,25; 250 мкг/мл соответственно.

2. Синтезирован и охарактеризован маркер, представляющий собой 15-нм золотые наночастицы с ковалентно пришитыми тиол-модифицированными олигонуклеотидами длиной 33 основания.