

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ЗОЛОТЫХ
НАНОЧАСТИЦ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 Биология
биологического факультета
Урюпиной Татьяны Андреевны

Научный руководитель:

канд. биол. наук, доцент

(подпись, дата)

Е.С. Тучина

Научный консультант:

канд. биол. наук, н.с.

лаборатории нанобиотехнологии

ИБФРМ РАН

(подпись, дата)

Т.Е. Пылаев

Заведующий кафедрой:

доктор биол. наук, профессор

(подпись, дата)

С.А. Коннова

Саратов 2020

Введение. Наночастицы золота в сочетании с нуклеиновыми кислотами, главным образом ДНК (ЗНЧ–ДНК), широко используются для внутриклеточной доставки генетических векторов и зондов, улучшения технологии анализа ПЦР, для разработки методов генетической диагностики (обнаружения ДНК–мишени) [1, 2]. Водородные связи нуклеиновых кислот обеспечивают специфичность и точность, необходимые для использования ДНК ЗНЧ в качестве биосенсоров. Известны две основные стратегии получения комплексов ЗНЧ–ДНК – использование ковалентного сшивания тиолмодифицированных олигонуклеотидных зондов на поверхности ЗНЧ или основанное на взаимодействии зондов ДНК и ЗНЧ по механизму физической адсорбции [3, 4]. Сравнительно высокая стоимость и трудоемкость процедуры получения конъюгатов ЗНЧ и модифицированных тиолом олигонуклеотидных зондов являются существенными недостатками в разработке сенсоров ДНК. Колориметрические методы, основанные на использовании немодифицированных ЗНЧ, являются одними из наиболее удобных для обнаружения ДНК в практических применениях, поскольку они достаточно чувствительны – даже пикомолярные концентрации целевой ДНК легко обнаруживаются невооруженным глазом. Однако разработка новых ДНК–тестов требует тщательной пошаговой оптимизации отдельных параметров коллоидных наночастиц.

Агрегация ЗНЧ приводит к контрастному изменению цвета растворов с красного на фиолетовый и сопровождается значительными изменениями в спектрах экстинкции и рассеяния из-за оптического взаимодействия частиц в кластерах [2]. Таким образом, агрегационные свойства ЗНЧ играют основную роль во всех вариантах колориметрического анализа ДНК. Максимум поглощения на длине волны плазмонного резонанса около 520 нм определяет ярко–красный цвет ЗНЧ. При агрегации по типу физической адсорбции отсутствие спектральных изменений при добавлении некомплементарной ДНК подтверждает специфичность реакции и зависимость степени агрегации от точечных мутаций. Было предложено использование зонда ssДНК,

немодифицированных частиц ЗНЧ и положительно заряженных полиэлектролитов для обнаружения молекул ДНК. Наряду с изменениями цвета (спектры поглощения и рассеяния) агрегацию ЗНЧ можно обнаружить по изменениям силы света флуоресцентных меток, связанных с ДНК–зондом или в растворе. Образование агрегатов ЗНЧ может быть исследовано методом динамического рассеяния света (ДРС), который характеризует размер частиц и агрегатов.

В фотодинамической терапии широко используются золотые наноклетки и нанооболочки, что обусловлено возможностью настройки ПППР видимом и ближнем ИК спектре. Золотая нанооболочка представляет собой сферический слой золота вокруг заполненного или полого ядра. В данной области спектра биологические ткани и жидкости поглощают и рассеивают свет и обеспечивают ряд применений: фотодинамическая и фототермическая терапия, лазерная фототерапия раковых клеток и опухолей, адресная доставка антибиотиков и антител [5]. Значительная часть исследований в области применения в фотодинамической и фототермической терапии золотых наноклеток и нанооболочек осуществляется на бактериальных культурах. Для оценки жизнеспособности бактериальных клеток чаще всего используется подсчет колониеобразующих единиц. Такой метод является довольно чувствительным и недорогим, однако требующим много времени.

Актуальность темы бакалаврской работы определяется тем, что на данный момент при использовании немодифицированных ЗНЧ для экспресс-методов определения нуклеиновых кислот возникают проблемы, связанные с дороговизной оборудования, неточностями при работе с наночастицами квазисферической формы, так как использование ЗНЧ с низкой степенью полидисперсности и полиморфности имеет принципиальное значение при использовании метода ДРС для колориметрического анализа ДНК.

Исходя из вышесказанного, целью бакалаврской работы было выявление взаимодействия ДНК с золотыми наночастицами в растворах методами спектроскопии поглощения и динамического рассеяния света на примере

комплексов олигонуклеотидов и положительно заряженных наночастиц золота; определение цитотоксического влияния инфракрасного (ИК) лазерного излучения на комплексы бактерий и наночастиц.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие задачи исследования:

- провести анализ работ, посвященных исследованию различных типов синтеза и стабилизации ЗНЧ, применения ЗНЧ–ДНК комплексов для использования ЗНЧ в качестве биосенсоров, фотосенсибилизирующих агентов;
- исследуя влияние размера, формы и поверхностного заряда ЗНЧ на воспроизводимость колориметрического ДНК–теста, провести детальную оптимизацию параметров комплексов положительно заряженных ЗНЧ и ДНК для применения в детектировании коротких фрагментов ДНК;
- определить чувствительность и специфичность оптимизированного ДНК–теста на основе немодифицированных положительно заряженных ЗНЧ с вариантами детекции методами спектроскопии поглощения и динамического рассеяния света;
- установить цитотоксическое действие ИК лазерного излучения на комплексы золотых наноклеток и нанооболочек и бактерий.

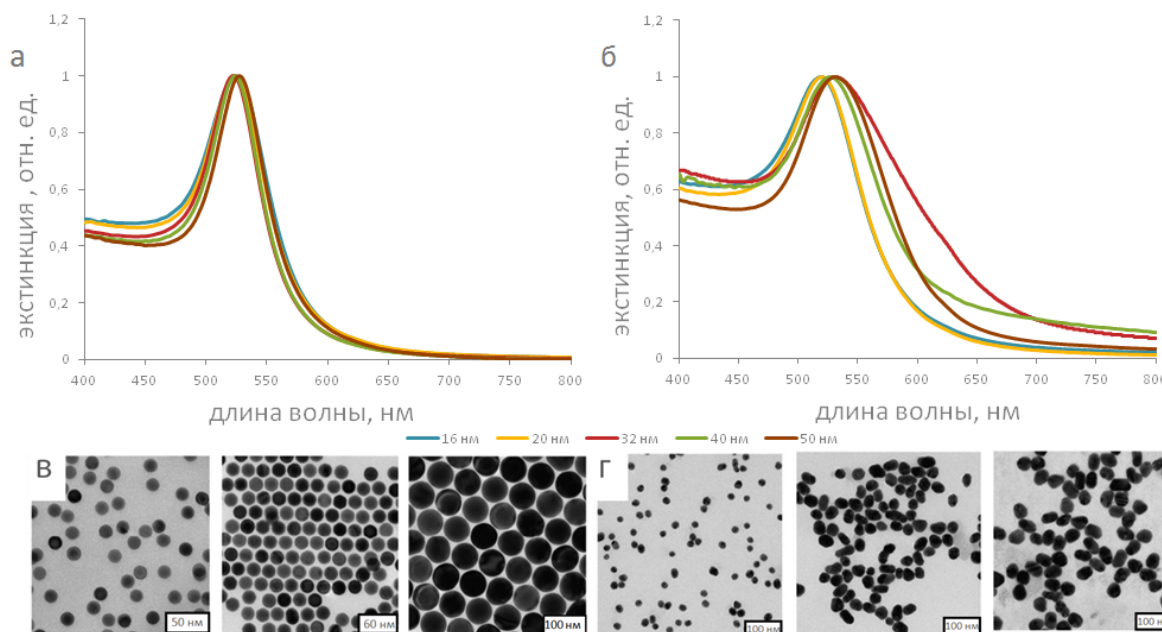
Работа состоит из введения, основной части, содержащей 3 главы, заключения, выводов и списка использованных литературных источников (93 наименования). Работа изложена на 50 страницах, иллюстрирована 9 рисунками и включает 2 таблицы.

Основное содержание работы.

Характеристика золотых наночастиц

Наиболее распространенный протокол получения золотых наносфер по методу Френса позволяет получать ЗНЧ квазисферической формы, для которых характерно уширение спектра и несоответствие положения и интенсивности спектрального пика расчетным значениям, как это можно увидеть на рисунке 1,б. Метод дорастивания «зародышей», предложенный [Ошибка! Закладка не определена.], позволяет получать моодисперсные образцы ЗНЧ

идеальной сферическую форму, и контролировать размер частиц в широком диапазоне от 10 до 150 нм (рисунок 1,а). На рисунке 1 показаны ТЭМ изображения наночастиц различных диаметров, полученных методикой дорастивания «зародышей» (в) и методом Френса (г).



а – спектры экстинкции ЗНЧ; б - спектры экстинкции КЗ;

в - ТЭМ изображения ЗНЧ; г - ТЭМ изображения КЗ

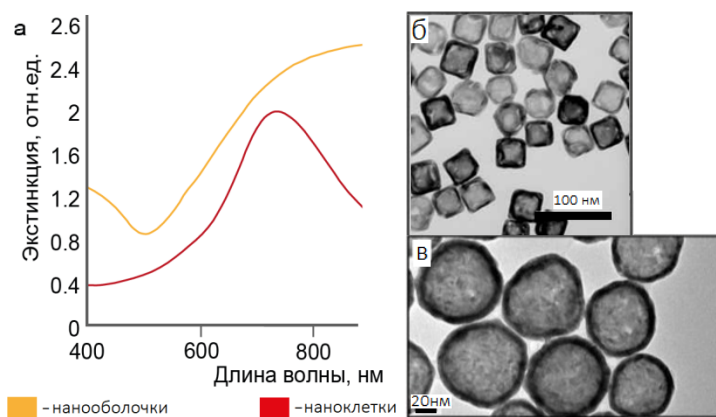
Рисунок 1 – Оптические свойства наночастиц ($d=16, 20, 32, 40$ и 50 нм)

Использование образцов наночастиц с низкой степенью полидисперсности и полиморфности имеет принципиальное значение. Также использование данной методики позволяет более точно определять размеры частиц только с помощью ДРС, т.к. удастся избежать появления ложных пиков на гистограмме, связанное с вращательной диффузией квазисферических ЗНЧ, в связи с чем результаты ДРС согласовываются с данными ЭМ. Свежеприготовленные образцы ЗНЧ мы охарактеризовали методами ТЭМ и ДРС и получили значения средних размеров частиц: $15,7 \pm 0,6$ нм, $20,6 \pm 0,9$ нм, $31,7 \pm 1,1$ нм.

Использование золотых наноклеток и нанооболочек обусловлено возможностью настройки ППР видимом и ближнем ИК спектре. Золотая нанооболочка представляет собой сферический слой золота вокруг заполненного или полого ядра. В данной области спектра биологические ткани

и жидкости поглощают и рассеивают свет и обеспечивают несколько применений.

Свежеприготовленные образцы ЗНЧ мы охарактеризовали методом ТЭМ и определили спектры экстинкции (рисунок 2) и получили значения средних размеров частиц: средний диаметр наноклеток (Au–C) составил 53 ± 5 нм, толщину стенки – 7 ± 2 нм, диагональ – 78 нм. Средний размер наноболочек (Au–S) составил 120 ± 15 нм (силикатное ядро) и 20 ± 7 нм (золотая оболочка).



а – спектры экстинкции ЗНЧ; б - ТЭМ изображения наноболочек;

в - ТЭМ изображения наноклеток

Рисунок 2 – Оптические свойства золотых наноболочек и наноклеток

Оптимизация колориметрического теста с положительно заряженными золотыми наносферами

Средний диаметр частиц КЗ и ЗНЧ составлял 16, 20, 32, 40 и 50 нм. Концентрация золота свежеприготовленных растворов была эквивалентна 57 мкг/мл. Колориметрический тест с наносферами был оптимизирован по форме частиц, их коллоидной стабильности в гибридизационном буфере, по концентрации ЦТАБ и по минимальной концентрации молекул мишеней.

Свежеприготовленные коллоидные растворы ЗНЧ повторно центрифугировали и ресуспендировали в растворах ЦТАБ различных концентраций. Затем полученные препараты проверяли на коллоидную устойчивость путем приготовления смесей полученных ЗНЧ в воде и в гибридизационном буфере. Для каждой смеси регистрировали спектр

экстинкции. Все ЗНЧ от 20 до 50 нм не прошли тест на коллоидную стабильность – после добавления зонда они агрегировали.

На рисунке 3 представлены спектры поглощения ЗНЧ 16, ресуспендированных в растворе ЦТАБ с концентрациями 3 (а) и 5 мМ (б). Коллоидная стабильность ЗНЧ в растворах ЦТАБ с концентрациями 1 мМ, 3 мМ и 5 мМ была проверена при постоянной концентрации зонда. В результате для ЗНЧ 16 была найдена оптимальная концентрация ЦТАБ 5мМ.

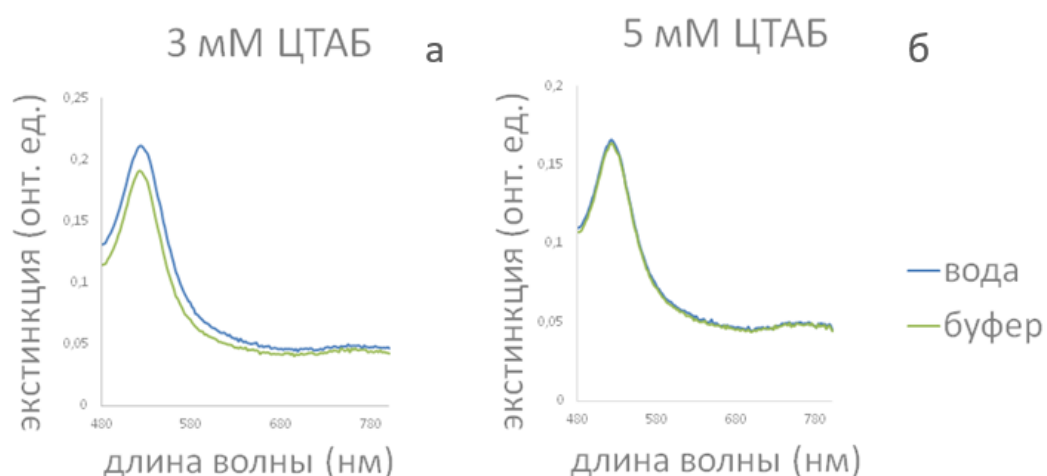


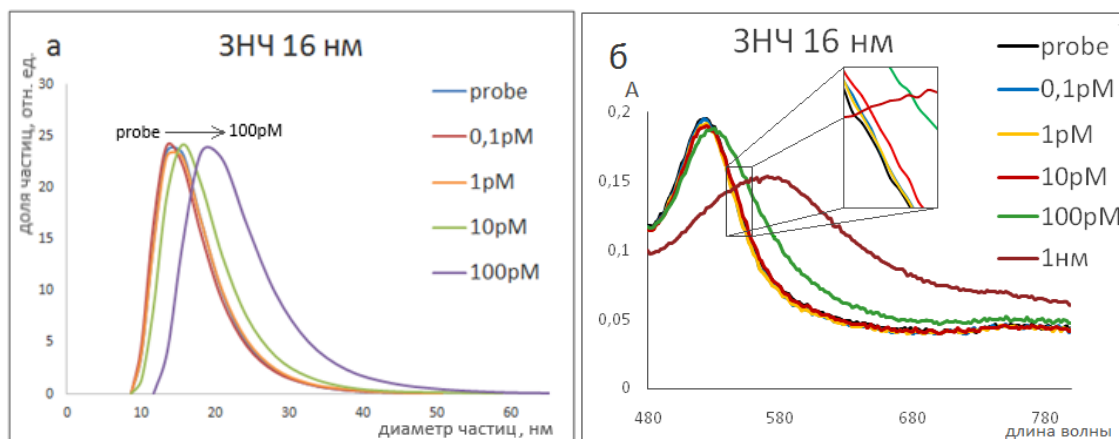
Рисунок 3 – Спектры экстинкции растворов 16 нм золотых наносфер

Для определения оптимальной концентрации раствора молекулы-мишени, готовили смеси растворов ЗНЧ, зондовой молекулы и молекулы-мишени (с финальными концентрациями от 0,1 пМ до 1 нМ) в гибридизационном буферном растворе (50 мМ Tris-HCl, pH 7.4; 1.2 М NaCl и вода Milli-Q в объемном соотношении 1:1:2). Для каждой смеси регистрировали спектр экстинкции. Важным условием выполнимости колориметрического теста является минимальная концентрация зондовой оцДНК, используемая для обнаружения кДНК мишени в области предела детекции.

Чувствительность и специфичность колориметрического и ДРС тестов

Определение предела чувствительности колориметрического теста проводили с разными концентрациями оцДНК-мишеней (100 пМ, 10 пМ, 1 пМ, 0,1 пМ). Чувствительность колориметрического определения ДНК-мишеней с

немодифицированными 16 нм золотыми наночастицами составляет 10 пМ (рисунок 4,б), а ДРС измерения более чувствительны с пределом обнаружения около 1 пМ (рисунок 4,а). Полученные результаты о пределах детекции представлены в таблице 1.



а - диаметр наночастиц; б - спектр экстинкции

Рисунок 4 – Зависимость интенсивности рассеяния от параметров
16 нм золотых наносфер

В случае использования модифицированных ЗНЧ тиолированными олигонуклеотидными зондами слабостью является высокая стоимость и техническая сложность введения тиольной модификации молекулы зонда, а также длительность получения конъюгатов. Для использования точечного теста требуется использование дорогостоящего оборудования. Колориметрические методы, основанные на использовании немодифицированных ЗНЧ [Ошибка! Заложка не определена.], являются одними из наиболее удобных для детекции ДНК в практическом применении, так как они довольно чувствительны – даже пикомолярные концентрации ДНК мишеней легко обнаружить невооруженным глазом. Наши исследования были направлены на изучение условий применимости ЗНЧ для колориметрического детектирования молекул ДНК–мишеней и разработку нового метода колориметрической детекции олигонуклеотидов в растворе.

Средний диаметр наноклеток (Au–C) составлял 60 нм; средний размер наноболочек (Au–S) составлял 150 нм. Концентрация (Au–C) и (Au–S) в

растворах составляла $\sim 10^{10}$ шт/мл и $\sim 10^9$ шт/мл соответственно. ППР Au–С локализован в области 750 нм; ППР Au–S – в области 850 нм.

Таблица 1 – Данные колориметрического анализа ДНК и диаметры ЗНЧ по данным ДРС

ЗНЧ, нм	ЦТАБ, мМ	предел детекции ДНК		Диаметр ЗНЧ
		UV-vis	ДРС	
16	5	10 пМ	1 пМ	15,7±0,6
20	5	–	–	20,6±0,9
32	–	–	–	31,7±1,1
40	–	–	–	н.д.
50	–	–	–	н.д.

Примечание: н.д. – нет данных

Определение фототермической и цитотоксической активности

Было отмечено, что использование ИК лазерное излучения на микроорганизмы без добавления к ним наночастиц не приводит к значительному угнетению роста. Обработка бактериальных клеток золотыми наноклетками в сочетании с инфракрасным лазерным излучением с длиной волны 808 нм (60 мВт/см^2) приводила к снижению численности *S. aureus* 209 Р на 15% после 5 мин воздействия, на 19% после 10 мин, на 25% после 15 мин, на 50% после 30 мин (рисунок 5). За все время облучения температура раствора, содержащего бактериальные клетки и золотые наноболочки возросла на 5°C (таблица 2).

При воздействии излучения с длиной волны 805 нм (46 мВт/см^2) на *S. aureus* 209 Р, проинкубированные с золотыми наноклетками, отмечено сокращение числа КОЕ на 38% после 5 мин воздействия, на 47% после 10 мин, на 50% после 15 мин, на 70% после 30 мин (рисунок 6). При этом увеличение температуры раствора, содержащего *S. aureus* 209 Р и золотые наноклетки, отмечено на 3°C (таблица 2).

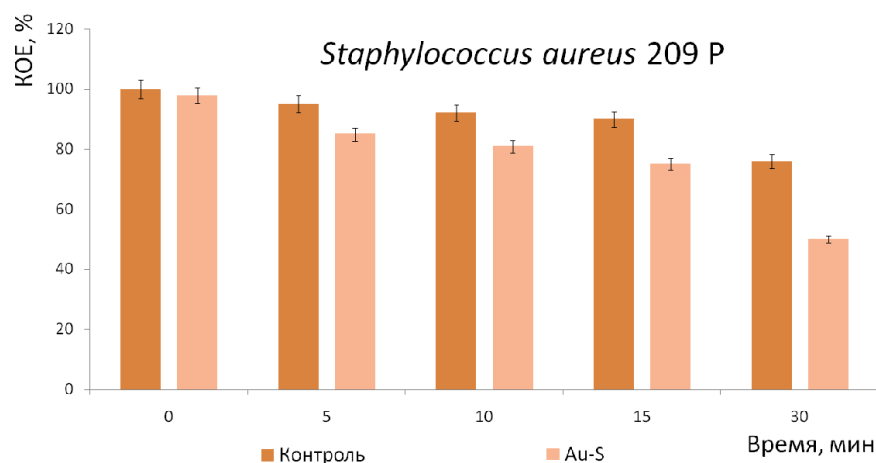


Рисунок 5 – Влияние ИК лазерного излучения (805 нм) на бактерии, обработанные золотыми наноболочками (Au-S)

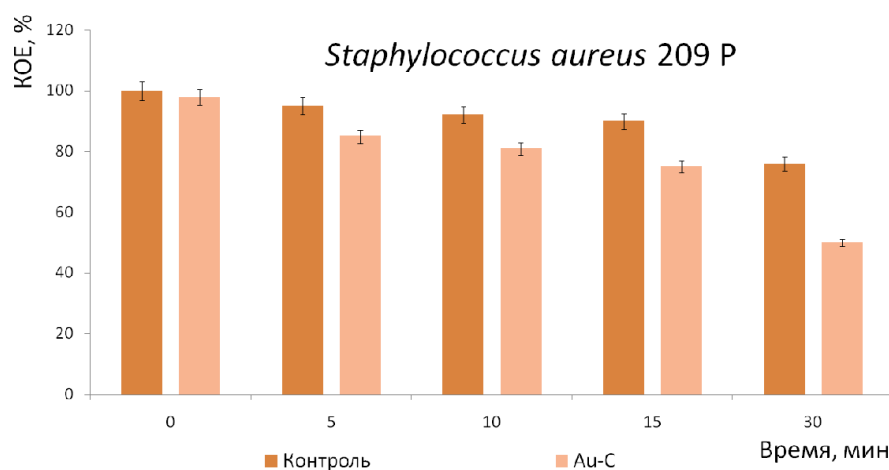


Рисунок 6 – Влияние инфракрасного лазерного излучения (808 нм) на бактерии, обработанные золотыми наноклетками (Au-C)

Таблица 2 – Изменение температуры взвеси, содержащей *S. aureus* 209 P, при воздействии инфракрасного лазерного излучения

Время, мин	T°C			
	808 нм		805 нм	
	ИК	ИК+Au-C	ИК	ИК+Au-S
0	22	22	22	22
5	23	23,5	23	24
10	23	24,5	23	25
15	23	25	23	25
30	23	28	23	26
ΔT°C	1	6	1	4

В заключении и выводах подведены итоги экспериментов.

1. Анализ литературных источников показал, что на данный момент существует недостаточное количество работ, посвященных решению проблемы влияния размеров ЗНЧ на воспроизводимость колориметрического теста ДНК.

2. Метод динамического рассеяния имеет большую чувствительность в определении ДНК-мишеней по сравнению со спектроскопией поглощения. Соответствующие минимальные концентрационные пределы детектирования – 1 пМ и 10 пМ при объеме пробы порядка 100 мкл.

3. В отличие от квазисферических наночастиц, частицы с идеальной сферической формой практически непригодны для колориметрического теста вследствие их низкой коллоидной стабильности.

4. Наибольшую эффективность при антимикробном фототермическом воздействии показало сочетание лазерного ИК излучения (805 нм, 46 мВт/см²) и золотых наноболочек – снижение числа КОЕ отмечено на 68%.

Список использованных источников

1. Oligonucleotide-modified gold nanoparticles for intracellular gene regulation / N.L. Rosi [et al.] // Science. – 2006. – V. 312. – P. 1027-1030.
2. Gold nanoparticle-assisted polymerase chain reaction: effects of surface ligands, nanoparticle shape and material / E.V. Vanzha [et al.] // RSC Adv. – 2016. – V. 6. – P. 110146-110154.
3. A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials / C.A. Mirkin [et al.] // Nature. – 1996. – V. 382. – P. 607-609.
4. Li, H., Rothberg, L. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles / H. Li, L. Rothberg // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2004. – V. 101, N. 39. – P. 14036-14039.
5. Boisselier, E., Astruc, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity / E. Boisselier, D. Astruc // Chem. Rev. – 2009. – V. 38. – P.1759-1782.