

УДК 577.29; 539.25; 546.05
©Коллектив авторов

ПРИМЕНЕНИЕ КОНЬЮГАТОВ СРЕПТАВИДИНА С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ЕДИНИЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ДНК НА ПОВЕРХНОСТИ КРЕМНИЯ

Г.В. Преснова^{1,3}, М.Ю. Рубцова^{1,3}, Д.Е. Преснов⁴, В.Г. Григоренко^{1,3},
И.В. Яминский², А.М. Егоров^{1,3}*

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 3; тел.: 8(495) 939-27-27; факс: 8(495)939-27-42;
эл. почта: mrubtsova@gmail.com

²«Центр перспективных технологий», Москва

³«НПП Иммунотех», Москва

⁴НИИ ядерной физики, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва

Проведено исследование возможностей метода сканирующей электронной микроскопии для визуализации результатов единичных актов гибридизации ДНК и олигонуклеотидных зондов с использованием наночастиц золота в качестве метки. В исследуемую ДНК или олигонуклеотид вводили молекулу биотина, которую затем выявляли в дуплексах ДНК с использованием конъюгата стрептавидина с наночастицами золота. Показано, что эффективная визуализация дуплексов ДНК возможна с использованием конъюгата, полученного методом ковалентного связывания. Предел обнаружения модельного олигонуклеотида из 19 оснований составил 20 пг.

Ключевые слова: гибридизационный анализ ДНК, единичные биоспецифические взаимодействия, наночастицы золота, сканирующая электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Регистрация единичных биоспецифических взаимодействий в протеомике позволяет существенно повысить чувствительность методов определения белков [1]. Аналогичный подход может быть применен и для анализа единичных взаимодействий ДНК и олигонуклеотидов. Вследствие небольшого размера олигонуклеотидных зондов, обычно используемых для идентификации ДНК, разрешение современных методов микроскопии не позволяет надежно регистрировать их комплексы на поверхности носителей. Для этих целей перспективным является использование меток, например, наночастиц золота, которые активно используются в настоящее время в различных видах биоспецифического анализа [2, 3].

В новейших направлениях наносенсорики значительную роль играют электроннолучевые методы сверхвысокого разрешения, к которым относится сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). При облучении поверхности образца сфокусированным электронным зондом электроны зонда взаимодействуют с веществом на поверхности, и возникают ответные сигналы различной физической природы, например, вторичные электроны. Их детекция используется для синхронного построения изображения объекта. Одним из существенных достоинств СЭМ является возможность быстрого исследования образцов практически без предварительной подготовки их поверхности. Метод обычно используется для исследования морфологии объектов или поверхностей и позволяет изучить их структуру на молекулярном уровне [4, 5].

* - адресат для переписки

КОНЬЮГАТЫ СРЕПТАВИДИНА С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ ДНК

Целью данной работы явилось исследование возможностей метода СЭМ для визуализации результатов единичных актов гибридизации ДНК и олигонуклеотидных зондов с использованием наночастиц золота в качестве метки. Разрешающая способность электронного микроскопа составляет величины порядка 1 нм, что позволяет детектировать наноструктуры золота. Для выявления дуплексов ДНК использовали два типа меток. Молекулу биотина вводили в исследуемую ДНК или олигонуклеотид и затем её выявляли в дуплеках ДНК с использованием конъюгата стрептавидина с наночастицами золота. В задачи работы также входила оптимизация способов синтеза конъюгата стрептавидина с наночастицами, позволяющего эффективно выявлять дуплеки ДНК на поверхности кремния.

МЕТОДИКА

Наночастицы золота получали по методу Frens, основанном на восстановлении золотохлористоводородной кислоты цитратом натрия [6]. Размеры полученных наночастиц золота были определены методом СЭМ.

Для получения конъюгата стрептавидина с наночастицами золота методом электростатического взаимодействия доводили рН раствора коллоидного золота (5 мл) до 7,0 свежеприготовленным раствором Na_2CO_3 , затем добавляли раствор стрептавидина в 10 мМ К-фосфатном буфере рН 7,2 и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре при перемешивании. Затем добавляли сахарозу и БСА до конечной концентрации 10% и 0,2%, соответственно. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре раствор центрифугировали 30 минут при 11000 об/мин и температуре 4°C. Супернатант удаляли, осадок растворяли в 10 мМ буфере трис-НСl рН 7,2, содержащем 0,04% ПЭГ-20000.

Для получения конъюгата стрептавидина с наночастицами золота методом ковалентного связывания стрептавидин (2 мг в 200 мкл 10 мМ К-фосфатном буфере рН 7,2) модифицировали 3,2 мг меркаптоянтарной кислоты в присутствии 3 мг карбодиимида ЭДК в течение ночи при 4°C. После этого добавляли 5 мкл 0,1 М дитиотриэтола и 10 мкл 10 мМ ЭДТА, перемешивали 30 мин при комнатной температуре. Полученный раствор диализовали против фосфатного буфера с ЭДТА. Затем доводили рН раствора коллоидного золота до 7,0 свежеприготовленным раствором Na_2CO_3

и добавляли стрептавидин, модифицированный меркаптоянтарной кислотой. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре, раствор центрифугировали 30 мин при 11000 об/мин на центрифуге 5810R ("Eppendorf", Германия) при температуре 4°C. Затем супернатант удаляли, осадок растворяли в 10 мМ К-фосфатном буфере рН 7,2.

Поверхность кремниевых пластин очищали кислородной плазмой в установке реактивного ионного травления RDE-300 ("Alcatel", Франция) в течение 30 мин. Затем поверхность кремния химически модифицировали [7]. Для этого кремний обрабатывали 10 мМ раствором 3-глицидопропилтриметоксисилана (ГОПС) в сухом толуоле в течение 12 ч при 80°C, затем отмывали и выдерживали при 100°C в течение 10 мин. Олигонуклеотидные зонды, модифицированные аминогруппой на 5'-конце, наносили на поверхность модифицированного кремния из растворов с концентрацией 20 пмоль/мкл в 0,25 М Na-фосфатном буфере, содержащем 0,3 М Na_2SO_4 . После иммобилизации проводили блокирование свободных центров связывания белков на поверхности кремния в растворе, содержащем 1% БСА и 1% казеин в 10 мМ К-фосфатном буфере рН 7,2, содержащем 0,15 М NaCl. Гибридизацию с олигонуклеотидом, меченным биотином, проводили в буфере 0,05 М NaH_2PO_4 , 0,5 М NaCl, 0,005 М ЭДТА, рН 7,4 при температуре 45°C в течение 2 ч. Отмывку проводили 10 мМ К-фосфатным буфером рН 7,2, содержащем 0,15 М NaCl и 0,1% твин-20. Затем инкубировали с конъюгатом стрептавидина с наночастицами золота в течение 45 мин при 37°C и отмывали. Измерения количества наночастиц на поверхности кремния проводили в растровом сканирующем электронном микроскопе Supra-40 производства "Carl Zeiss" (Германия) со встроенным в колонну микроскопа детектором вторичных электронов "InLens". Ускоряющие напряжения и ток луча подбирались для того, чтобы золотые частицы были видны с наилучшим разрешением и контрастом. Количество выявленных частиц подсчитывали с использованием программного обеспечения Gwyddion ("Czech Metrology Institute", Чехия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование процессов гибридизации олигонуклеотидов комплементарной структуры на поверхности кремния проводили на модельной системе, схема которой представлена на рисунке 1.

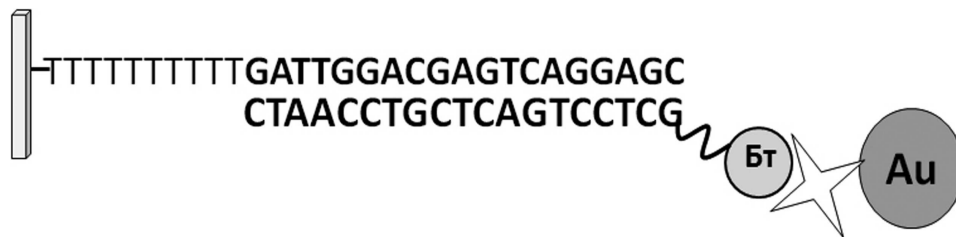


Рисунок 1. Схема модельной системы для изучения единичных взаимодействий ДНК на поверхности кремния.

Олигонуклеотидный зонд из 19 оснований и олигонуклеотидного линкера из 13 тиминов (5'-NH₂-TTTTTTTTTTTTTTGATTGGACGAGTCAGGAGC-3') ковалентно иммобилизовали на поверхности кремния, модифицированного ГОПС. Затем проводили реакцию гибридизации с комплементарным по структуре олигонуклеотидом, меченым биотином (5'-биотин-GCTCCTGACTCGTCCAATC-3'). Молекулы биотина в образовавшихся на носителе дуплексах ДНК выявляли конъюгатом стрептавидина с наночастицами золота. В работе использовали наночастицы золота сферической формы, их размер составлял 27±3 нм.

Для выявления биотина в дуплексах ДНК на носителе были синтезированы два типа конъюгатов стрептавидина с наночастицами золота. Первый тип конъюгата был получен методом электростатического взаимодействия заряженных групп белка и стабилизированных ионами цитрата наночастиц золота (методом нековалентного связывания), второй – методом ковалентного связывания стрептавидина, модифицированного меркаптоэтановой кислотой, с наночастицами золота. На рисунке 2 показана поверхность кремния с дуплексами ДНК на носителе после выявления конъюгатом, полученным методом ковалентного связывания (а) и методом электростатической адсорбции (б). Анализ поверхностей, полученных с использованием двух типов конъюгатов стрептавидина с золотом, показал, что только конъюгат, полученный методом ковалентного связывания, может быть использован для эффективного выявления результатов гибридизации олигонуклеотидов. Конъюгат, полученный методом электростатического взаимодействия, диссоциировал на отдельные компоненты в процессе отмывки, в результате чего наночастицы золота десорбировались с поверхности носителя.

Чёткое изображение наночастиц золота в составе дуплексов ДНК на поверхности кремния, регистрируемое методом СЭМ, позволяет визуализировать единичные взаимодействия олигонуклеотидов или ДНК. При этом

число наночастиц золота, регистрируемых в зоне реакции, было пропорционально числу дуплексов ДНК, образовавшихся в анализируемой области носителя.

Количество и размер частиц, наблюдаемых в кадре, зависели от увеличения электронного микроскопа и, соответственно, размера кадра. Было протестировано три различных увеличения 15000×, 75000×, 35000×; при этом площадь кадра электронного микроскопа составила 1,7 мкм², 6,8 мкм², 32,2 мкм², соответственно. При большом размере кадра получали более точные значения числа частиц, однако с увеличением размера кадра падает разрешение электронного микроскопа, что снижает разрешение отдельных частиц. Для изучаемой модельной системы дуплексов ДНК, меченных наночастицами размером около 30 нм, оптимальным увеличением микроскопа было значение 75000×.

Оптимизация условий проведения гибридизационного анализа и отмывки несвязавшихся компонентов позволила добиться очень низких значений неспецифического связывания конъюгата как в зоне носителя, на которую не наносили олигонуклеотидные зонды, так и в зоне носителя, на которую наносили неспецифический олигонуклеотидный зонд. Эти величины составили не более 1-2 частиц золота на площадь кадра при увеличении 75000×. Это позволило добиться высоких значений соотношения сигнал/фон (от 10 до 80 в зависимости от количества выявляемого олигонуклеотида).

На рисунке 3 приведена калибровочная кривая определения меченого олигонуклеотида методом гибридизационного анализа с использованием наночастиц золота в качестве метки и их регистрацией методом СЭМ. В качестве аналитического параметра использовали количество наночастиц золота в кадре микроскопа, которое было пропорционально числу единичных взаимодействий биоспецифических молекул на данном фрагменте поверхности. Предел обнаружения олигонуклеотида составил 20 пг.

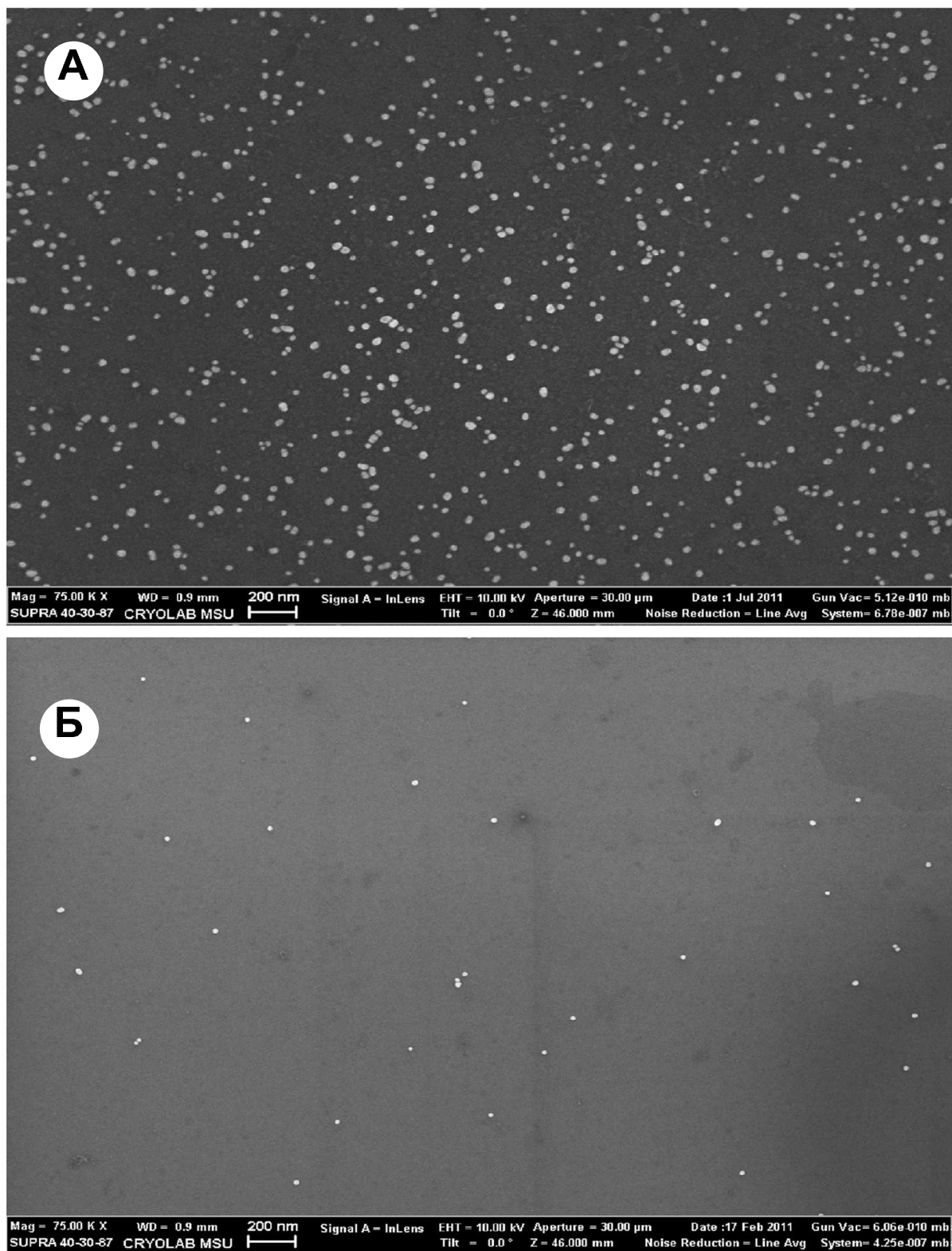


Рисунок 2. Изображение поверхности кремния с дуплексами ДНК, полученное методом СЭМ. Дуплексы ДНК выявляли конъюгатом стрептавидина с наночастицами золота, полученным методом ковалентного связывания (А), нековалентного связывания (Б).

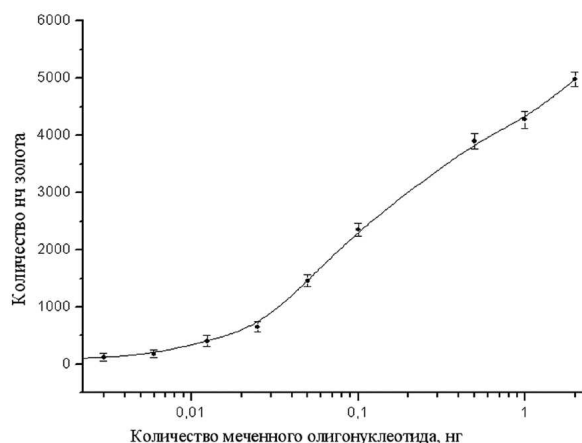


Рисунок 3. Калибровочная зависимость для определения количества олигонуклеотида методом гибридного анализа с наночастицами золота в качестве метки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Разработан метод исследования структуры ДНК на основе гибридного анализа с наночастицами золота в качестве метки и их регистрацией на поверхности носителя методом СЭМ. Показано, что эффективная визуализация дуплексов ДНК на кремнии возможна при использовании конъюгата стрептавидина с наночастицами золота, полученного методом ковалентного связывания. Разработанный метод соединяет достоинства наночастиц в качестве метки биоспецифических взаимодействий с высокой разрешающей

способностью метода СЭМ. Преимуществом разработанного метода является хороший динамический диапазон изменения значений аналитических сигналов и низкие значения неспецифического связывания конъюгата стрептавидина с наночастицами. Это приводит к существенному увеличению чувствительности анализа и отношения сигнал/фон.

Работа выполнена при поддержке ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы" (государственный контракт № 14.512.11.0026) и гранта РФФИ 11-02-01531а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A., Ivanov Yu., Lisitsa A., Zgoda V. (2007) *Proteomics*, **7**, 4-9.
2. Verdoold R., Gill R., Ungureanu F., Molenaar R., Kooyman R. (2011) *Biosens. Bioelectron.*, **27**, 77-81.
3. Taton T.A., Mirkin C.A., Letsinger R.L. (2000) *Science*, **289**, 1757-1760.
4. Cazaux J. (2005) *J. Microscopy*, **217**, 16-35.
5. Zhu L., Luo L., Wang Z. (2012) *Biosens. Bioelectron.*, **35**, 507-511.
6. Frens G. (1973) *Nat. Phs. Sci.*, **241**, 20-22.
7. Lamture J.B. et al. (1994) *Nucleic Acids Research*, **22**, 2121-2125.

Поступила: 10. 07. 2013.

CONJUGATES OF STREPTAVIDIN WITH GOLD NANOPARTICLES FOR THE VISUALIZATION OF DNA SINGLE INTERACTIONS ON THE SILICON SURFACE

G.V. Presnova^{1,3}, M.Yu. Rubtsova^{1,3}, D.E. Presnov⁴, V.G. Grigorenko^{1,3}, I.V. Yaminsky², A.M. Egorov^{1,3}

¹M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1, b.3, Moscow, Russia; tel.: +7-495-939-2727; fax: +7-495-939-2742; e-mail: mrubtsova@gmail.com

²Advanced Technologies Center, Moscow, 119311 Russia

³RPE "Immunotek", Moscow, Russia,

⁴Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

The potential of the method of scanning electron microscopy (SEM) to visualize the results of individual acts of DNA and oligonucleotides hybridization using gold nanoparticles as label was investigated. Molecule of biotin was introduced into DNA or oligonucleotide, and then it was detected in DNA duplex using a conjugate of streptavidin with gold nanoparticles. Effective imaging of DNA duplexes was possible using a conjugate prepared by covalent binding.. The detection limit of the model oligonucleotide of 19 bases was 20 pg.

Key words: hybridization analysis of DNA, single biospecific interactions, gold nanoparticles, scanning electron microscopy.