

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССОВ ФИЗИЧЕСКОЙ АДсорбЦИИ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ НА ПОВЕРХНОСТИ НАНОПЛЕНОК СЕРЕБРА

OPTIMIZATION OF THE PROCESSES OF FISICAL ADSORPTION OF MONOCLONAL ANTIBODIES ON THE SURFACE OF SILVER NANOFILMS

**Я. И. Мельникова^{1,2}, О. А. Матусевич^{1,2},
И. В. Коктыш^{1,2}, О. С. Кулакович³, С. А. Маскевич^{1,2}**

Ya. I. Melnikova^{1,2}, O. A. Matusevich^{1,2}, I. V. Koktysh^{1,2}, O.S. Kulakovich³, S. A. Maskevich^{1,2}

¹Учреждение образования «Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, Минск, Республика Беларусь
drkoktysz@gmail.com

²Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

³Институт физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

¹International State Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus

³B. I. Stepanov Institute of Physics of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

На сорбционную емкость нанопленок серебра влияет в большей степени их пространственная организация, чем концентрация покрывающего полиэлектролита, полидиаллилдиметиламмония хлорида (ПДАД-МАХ). На нанопленке NP-AgC1, покрытой ПДАДМАХ-C2, сорбция антител возрастает в 2,7 раз, в то время как на нанопленки NP-AgC2 с покрытием полиэлектролита в аналогичной концентрации, сорбция моноклональных антител увеличилась в 5,2 раза.

The sorption capacity of silver nanofilms is influenced to a greater extent by their spatial organization than the concentration of the coating polyelectrolyte, polydiallyldimethylammonium chloride (PDADMAC). The antibodies' sorption was increased in 2.7 or 5.2 times on the nanofilm NP-AgC1 or NP-AgC2, respectively, coated with PDADMAC-C2.

Ключевые слова: моноклональные антитела, наночастицы серебра, иммунофлуоресцентный анализ, полидиаллилдиметиламмония хлорид, конъюгаты флуоресцеина изотиоцианата.

Keyword: monoclonal antibodies, silver nanofilms, immunofluorescence analysis, polydiallyldimethylammonium chloride, fluorescein isothianate conjugates.

<https://doi.org/10.46646/SAKH-2023-1-406-410>

Введение. Аналитическая биотехнология позволяет разрабатывать новые экспериментальные подходы к созданию высокочувствительных методов анализа биологически активных соединений, позволяющих достоверно определять нано- и пикограмовые количества вещества в биологических жидкостях или в объектах окружающей среды. Создание иммунохимических биоаналитических тест-систем с использованием флуоресцентного метода детекции является современным биотехнологическим подходом, позволяющим повысить уровень чувствительности определения биологических веществ.

Применение спектрального инструментального оборудования позволяет осуществлять эффективную детекцию биоаналитов, в этом случае в качестве метки используются вещества, обладающие люминесцентными, флуоресцентными или иными спектральными свойствами. В качестве оптических преобразователей разнообразных биоспецифических взаимодействий широко используются наночастицы металлов, таких как золото и серебро, что позволяет сочетать в одной экспериментальной системе явление плазмонного резонанса и флуоресценции [1].

Наночастицы металлов, в частности золота и серебра и их композиты широко используются как эффективные оптические преобразователи разнообразных биоспецифических взаимодействий. Это обеспечивается сочетанными явлениями плазмонного резонанса, присущего наночастицам, и флуоресценции, свойственной кластерным соединениям. Количественная оценка меченых комплексов позволяет вычислять точную концентрацию анализируемого соединения в пробе с использованием калибровочных кривых [2,4].

Плазмонно-усиленная флуоресценция является одним из наиболее перспективных методов повышения чувствительности флуоресцентного иммунологического анализа. Подобные методические подходы представляют большой интерес для современной биологии (определение биологических макромолекул и метаболитов), медицины (диагностика заболеваний, фармакологический скрининг и мониторинг, оценка эффективности лечения)

и экологии (экспресс-мониторинг окружающей среды, количественный анализ загрязнителей, оценка эффективности процессов).

Цель работы: оптимизировать процессы нековалентной сорбции моноклональных антител на поверхности нанопленок серебра различной пространственной организации

Материалы и методы. В работе использовались следующие химические реактивы: нитрат серебра, цитрат натрия, полиэлектролит полидиаллилдиметиламмоний хлорид (ПДАДМАХ), флуоресцеин изотиоцианат (изомер I), хлорид натрия, бычий сывороточный альбумин (БСА) (все реактивы – производства компании Sigma Aldrich), моноклональные антитела класса G, меченые флуоресцеин-изоцианатом (IgG-FITC). Эксперименты проводились в прозрачных 96-луночных плоскодонных полистироловых планшетах для иммуноанализа (каталожный номер 762071, Greiner, Германия), с покрытием дна MICROLON 600 (high binding), с рабочим объемом лунки 350 мкл. Золь серебра был синтезирован по методу цитратного восстановления нитрата серебра. Серебряные наночастицы осаждали в лунки планшета по следующей схеме: 150 мкл золя серебра выдерживались в лунках полистирольного планшета в течение разных периодов времени от 1 до 24 ч при комнатной температуре. Таким образом, были получены пленки AgC1, AgC2, AgC3 при увеличении времени осаждения наночастиц соответственно.

Пленка AgC4 была сформирована на поверхности лунок из золя серебра после его длительного хранения в течение нескольких месяцев. Обработка изображений атомно-силовой микроскопии проводилась с помощью программного обеспечения анализа данных сканирующей зондовой микроскопии Gwyddion. На основании обработки 4-х изображений для каждого типа серебряных пленок был рассчитан параметр η – доля площади поверхности, занятой наночастицами. Формирование слоев полиэлектролитов на различных твердых подложках проводилось следующим образом: на поверхность наносили 150 мкл раствора ПДАДМАХ однократно, формируя один слой. Раствор инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Каждый этап процедуры заканчивался промывкой дистиллированной водой. Иммунизация моноклональных IgG-FITC на твердой фазе проводилась по следующей методике: в лунки полистироловых планшетов: интактных или покрытых комплексами, состоящими из нанопленок серебра и полиэлектролитов – вносили моноклональные IgG-FITC в количестве от 200 до 500 нг на 1 лунку в 150 мкл 10 мМ калий-натрий-фосфатного буфера, pH 7,4, и инкубировали 4 ч при +37 °C в темноте. Затем планшеты промывали тем же буфером и проводили измерения флуоресценции. Измерения интенсивности флуоресценции проводили (возбуждение: 483 нм, эмиссия: 530 нм) с помощью планшетного ридера CLARIOstarPlus (BMGLabtech, Германия).

Результаты и обсуждение. Для проведения экспериментов по оптимизации процессов нековалентной сорбции антител на поверхности серебряных нанопленок были выбраны три нанопленки, обладающие различной структурной организацией поверхности и различной плотностью наночастиц – NP-AgC1, NP-AgC2, NP-AgC3. Нанопленки были покрыты двумя концентрациями полиэлектролита ПДАДМАХ-C1 и ПДАДМАХ-C2. В качестве группы сравнения использовалась поверхность полистирола, покрытая ПДАДМАХ в аналогичной концентрации, в качестве контроля – интактная поверхность полистирола.

В первой серии экспериментов поверхность нанопленок серебра покрывалась катионным полиэлектролитом ПДАДМАХ в концентрации C1.

Как видно из представленных результатов (рисунок 1), при иммобилизации антител на поверхности нанопленки NP-AgC1 с увеличением концентрации антител количество белка, сорбирующегося на твердой фазе, возрастает до концентрации 400 нг IgG-FITC в пробе, а затем наступает стадия насыщения.

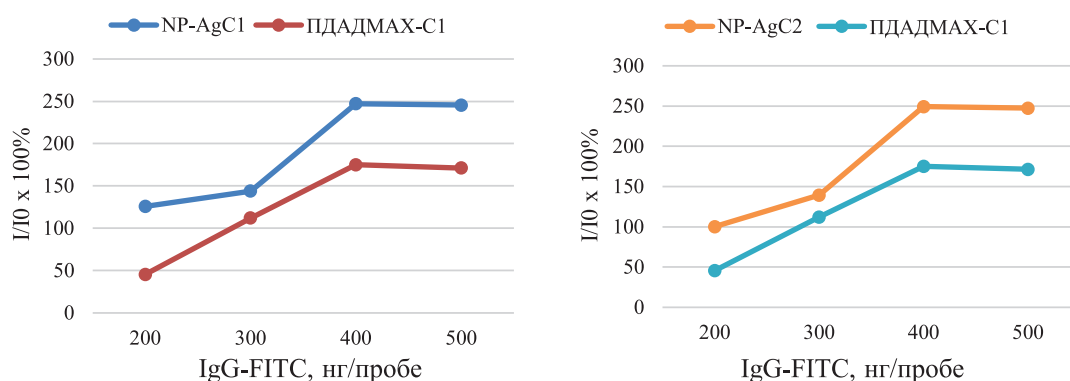


Рисунок 1 – Зависимость параметра неспецифической сорбции IgG-FITC на нанопленках NP-AgC1- ПДАДМАХ-C1 и NP-AgC2- ПДАДМАХ-C1 от концентрации внесенных антител

Аналогичная ситуация наблюдается при иммобилизации IgG-FITC на поверхности нанопленки NP-AgC2 (рисунок 1). Следует отметить, что в анализируемых экспериментах интенсивность флуоресцентного сигнала IgG-FITC, иммобилизованных на поверхности обеих нанопленок, превышала интенсивность флуоресцентного сигнала антител, иммобилизованных на поверхности ПДАДМАХ в 1,5–2,5 раза.

В целом кинетика иммобилизации иммуноглобулинов на поверхности только полиэлектролита ПДАДМАХ или нанопленок, покрытых этим полиэлектролитом, носит сходный характер, но отличается интенсивностью получаемого флуоресцентного сигнала.

Используемые поверхности твердой фазы отличаются по двум параметрам – наличием нанопленки серебра с одной стороны и поверхностной концентрацией ПДАДМАХ с другой. Усиление флуоресцентного сигнала может свидетельствовать, во-первых, о наличии эффекта плазмонного резонанса, который усиливает сам флуоресцентный сигнал, а во-вторых, о возможности увеличения поверхностной сорбции молекул иммуноглобулинов, которая возникает в результате увеличения концентрации ПДАДМАХ на твердой фазе.

При использовании в качестве твердой фазы нанопленки NP-AgC3, количество иммобилизованных антител продолжает увеличиваться до концентрации 500 нг IgG-FITC в пробе (рисунок 2). При этом следует отметить, что на поверхности, покрытой только ПДАДМАХ, максимальная сорбция IgG-FITC достигается при концентрации последнего в пробе равной 400 нг в пробе.

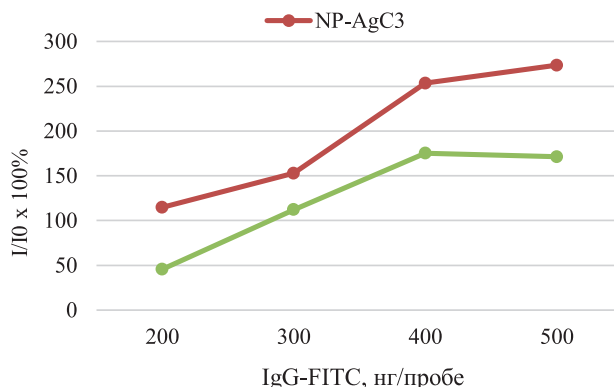


Рисунок 2 – Зависимость параметра неспецифической сорбции IgG-FITC на нанопленках NP-AgC3- ПДАДМАХ-C1 от концентрации внесенных антител

Во второй серии экспериментов поверхность нанопленок серебра покрывалась катионным полиэлектролитом ПДАДМАХ в концентрации C2.

При увеличении количества моноклональных IgG-FITC от 200 до 300 нг/лунку на поверхности ПДАДМАХ в концентрации C2, наблюдается незначительное увеличение флуоресцентного сигнала, а при добавлении антител в количестве 400 и 500 нг/лунку флуоресцентный сигнал достигает максимума и выходит на плато (рисунок 3).

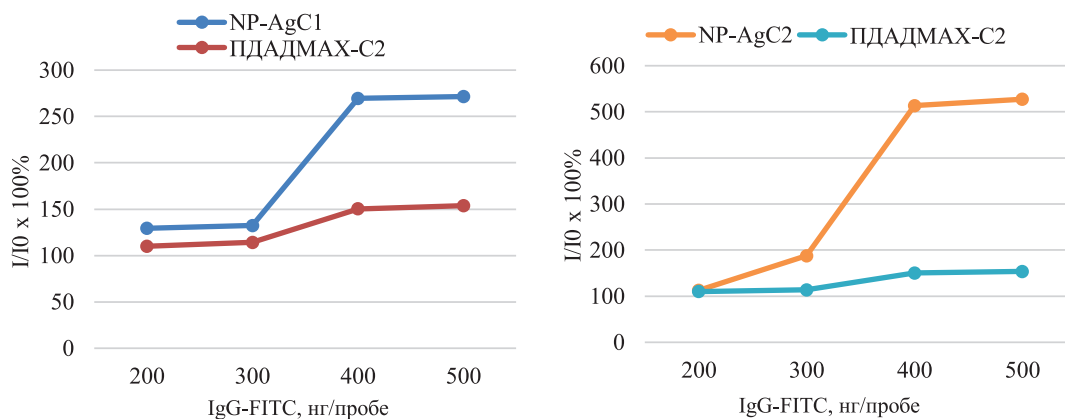


Рисунок 3 – Зависимость параметра неспецифической сорбции IgG-FITC на нанопленках NP-AgC1- ПДАДМАХ-C2 и NP-AgC2- ПДАДМАХ-C2 от концентрации внесенных антител

Внесение в лунки полистирольного планшета, покрытого нанопленкой NP-AgC1, IgG-FITC в количестве 200 и 300 нг/лунку дало незначительное усиления флуоресцентного сигнала. При увеличении количества вносимых моноклональных антител до 400 нг/лунку – флуоресцентный сигнал увеличился в 2,7 раза по сравнению с контролем и в 1,7 раза по сравнению с тем же образцом, нанесённым на твердую фазу, покрытую ПДАДМАХ-C2. (рисунок 3). Дальнейшее увеличение концентрации IgG-FITC не привело к увеличению флуоресцентного сигнала. Этот результат сопоставим с аналогичным результатом для этой нанопленки, только покрытой ПДАДМАХ в концентрации C1. Это свидетельствует о том, что увеличение концентрации полиэлектролита в случае именно этой нанопленки не приводит к увеличению сорбции IgG-FITC.

Как было установлено в ранее проведенных экспериментах [3], нанопленка серебра NP-AgC1, характеризуется коэффициентом заполнения наночастиц $\eta 15 \pm 3\%$. При данной плотности заполнения наночастицы серебра могут располагаться на поверхности неравномерно, и соответственно нанесенный полиэлектролит покрывает не только слой наночастиц, но и полиэлектролит, нанесенный до осаждения наночастиц. Тем самым могут образовываться два слоя полиэлектролита ПДАДМАХ.

Совершенно иная картина наблюдалась в экспериментах с использованием нанопленки NP-AgC2. При внесении IgG-FITC в концентрации уже 300 нг/лунку, флуоресцентный сигнал сразу увеличился в 2 раза, дальнейшее возрастание концентрации антител до 400 нг в пробе приводило к увеличению сигнала в 5,3 раза (рисунок 3). Сравнивая эти результаты с результатами аналогичных экспериментов, в которых был использован ПДАДМАХ в концентрации С1, можно отметить, что увеличение концентрации ПДАДМАХ, покрывающей нанопленку NP-AgC2, приводит к двукратному возрастанию количества сорбированного IgG-FITC.

Известно, что наноструктурированная пленка серебра NP-Ag-C2 характеризуется коэффициентом заполнения монослоя равным $37 \pm 8\%$ [3]. При такой поверхностной плотности наночастицы серебра покрывают большую площадь по сравнению с нанопленкой NP-AgC1, но пространственное распределение наночастиц может быть островным. Очевидно, что в этом случае достаточно большую площадь поверхности будут занимать молекулы ПДАДМАХ. Этот поликатионный полиэлектролит, как свободный, так и связанный с наночастицами серебра, обладает высокой плотностью заряда и, следовательно, более высоким сродством к связыванию и высокой селективностью по отношению к белкам [8]. Полиэлектролит ПДАДМАХ представляет собой высокомолекулярный катионный полимер, который имеет пространственно-нелинейный характер и содержит большое количество заряженных аммониевых групп в боковой цепи, благодаря чему ПДАДМАХ считается сильным полиэлектролитом, не зависящим от pH. Электростатическое притяжение между заряженными поверхностными группами является основной движущей силой для адсорбции полиэлектролитов на поверхностях с противоположным чистым зарядом [6]. Такой полиэлектролит принимает спиральную структуру в растворе, образуя множественные разветвленные петли и цепи, формируя структуры, похожие на клубки. Благодаря этому, при покрытии твердой фазы полиэлектролитом ПДАДМАХ, образуется рельефная поверхность, имеющая выступы с высокой плотностью заряда, что способствует иммобилизации молекул иммуноглобулинов и способствует увеличению регистрируемого сигнала [5-7].

Такое значительное увеличение сигнала, как упоминалась ранее, связано как с плазмонным эффектом, так и с использованием катионного полиэлектролита, который благодаря своей структуре образует рельефную поверхность, тем самым увеличивая сорбционную емкость белка. В водной среде белки и полиэлектролиты взаимодействуют и собираются вместе с образованием комплексов белок–полиэлектролит. Состав, структура и свойства комплексов белок–полиэлектролит определяются природой и силой взаимодействий белковых глобул и цепей полиэлектролита друг с другом, а также с их окружением [7]. На образование и стабилизацию комплекса ПДАДМАХ–белок влияют электростатические и неэлектростатические взаимодействия, такие как ван-дер-ваальсовы взаимодействия, гидрофобные и водородные связи. Водородные связи способны повлиять на конформацию белковых молекул, что влияет на стабильность комплекса. На электростатическое взаимодействие могут влиять различные физико-химические параметры: ионная сила, эффективность плотности заряда, pH раствора и молекулярная масса [5, 7].

Интенсивность флуоресценции, иммобилизованных IgG-FITC в концентрации 200, 300 и 400 нг/лунку на нанопленке NP-Ag-C3 (рисунок 4), покрытой слоем ПДАДМАХ-C2, практически аналогичны флуоресцентным сигналам, полученным на нанопленке NP-AgC1, покрытой той же концентрацией полиэлектролита, а также результатам, полученным для сорбции IgG-FITC при покрытии NP-AgC3 ПДАДМАХ-C1. Это свидетельствует о том, что для данной нанопленки увеличение концентрации ПДАДМАХ в два раза не приводит к увеличению количества сорбирующегося белка.

Особенность поверхностной структуры данной нанопленки заключается в том, что коэффициент заполнения поверхности наночастицами серебра составил $\eta 97 \pm 3\%$, что превышает теоретические возможную величину этого показателя для монослоя наночастиц, которая составляет 75%, что означает, что в результате осаждения наночастиц в течение суток сформировалась серебряная пленка с толщиной более чем один монослой. Таким образом, в данном случае ПДАДМАХ покрывает только наночастицы серебра и в этих условиях, использованная концентрация ПДАДМАХ С1 оказывается достаточной для оптимальной сорбции конъюгата IgG-FITC [3].

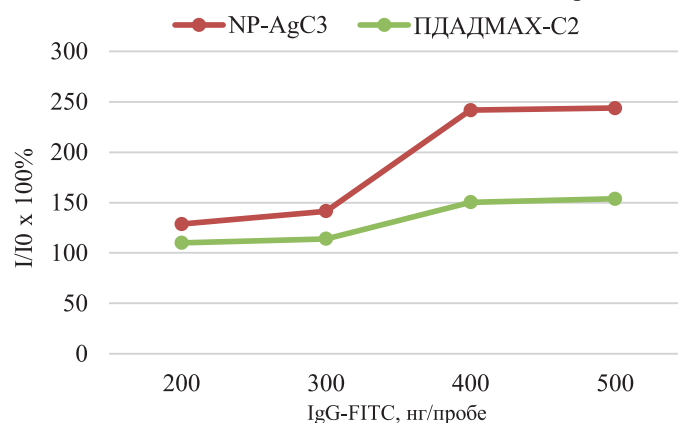


Рисунок 4 – Зависимость параметра неспецифической сорбции IgG-FITC на нанопленках NP-AgC3- ПДАДМАХ-C2 от концентрации внесенных антител

Таким образом, оптимальными концентрациями моноклональных антител IgG-FITC для сорбции на поверхности изученных нанопленок серебра NP-AgC1, NP-AgC2, NP-AgC3 являются 400 нг и 500 нг в пробе. В этих концентрациях для нанопленок серебра любой организации наблюдается наивысшие показатели сорбции, так как заполнены все возможные свободные центры для связывания белка.

На сорбционную емкость изучаемых нанопленок влияет в большей степени пространственная организация наноструктурированных пленок серебра, чем концентрация покрывающего полиэлектrolита ПДАДМАХ. На нанопленке NP-AgC1, покрытой ПДАДМАХ-C2, сорбция антител возрастает в 2,7 раз, в то время как на нанопленке NP-AgC2 с покрытием полиэлектrolита в аналогичной концентрации, сорбция моноклональных антител увеличилась в 5,1-5,2 раза. Для нанопленок NP-AgC1 и NP-AgC3 концентрация покрывающего полиэлектrolита не имела влияния на количество иммобилизуемого иммуноглобулина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Highly sensitive immunofluorescence assay of prostate-specific antigen using silver nanoparticles I. V. Koktysh [et.al.]. // *Journal of Applied Spectroscopy*. – 2020. – Vol. 87, № 5. – P. 796–803. – DOI: 10.1007/s10812-020-01083-2.
2. Влияние полиэлектrolитов на увеличение чувствительности иммунофлуоресцентного анализа на основе плазмонных серебряных наночастиц / И.В. Коктыш [и др.]. // *ЖБГУ. Биология*. – 2020. – №3. – С. 72-80. – DOI: 10.33581/2521-1722-2020-3-72-80.
3. Оптимизация структурных и оптических параметров плазмонных пленок серебра для флуоресцентного анализа конъюгата IgG-FITC / О.С. Кулакович [и др.]. // *Журнал прикладной спектроскопии*. – 2023. – Т.90, № 1. – С. 48-55. DOI: 10.47612/0514-7506-2023-90-1-48-55.
4. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches / X.-F. Zhang [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17. – DOI:10.3390/ijms17091534.
5. Protein-based polyelectrolyte multilayers / A. vander Straeten. [et.al.] // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2020. – Vol. 280. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102161.
6. Ion-implanted silver nanoparticles for metal-enhanced fluorescence / S. Iqbal [et al.] // *AIP Advances*. – 2018. – Vol. 8, № 9. – DOI: 10.1063/1.5045570.
7. Huang, J. Surface Forces between Highly Charged Cationic Polyelectrolytes Adsorbed to Silica: How Control of pH and the Adsorbed Amount Determines the Net Surface Charge / J. Huang, X. Liu and E. Thormann // *Langmuir*. – 2018. – Vol. 34. – № 25. – P. 7264-7271. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b00909.
8. Gao, S. Protein–Polyelectrolyte Complexes and Micellar Assemblies. / S. Gao, A. Holkar, S. Srivastava // *Polymers*. – 2019. – Vol. 11. - №7. – P. 1097. DOI:10.3390/polym11071097.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ МЕЖДУ ФЛУДАРАБИНОМ И ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ БЕТА МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

MODELING OF INTERACTIONS BETWEEN FLUDARABINE AND DNA POLYMERASE BETA BY THE METHOD OF MOLECULAR DYNAMICS

**С. Альбасри^{1,2}, А. А. Августинович^{1,2},
М. А. Ханчевский^{1,2}, Е. И. Квасюк^{1,2}, А. Г. Сыса^{1,2}**
S. Albasri^{1,2}, A.A. Avgustinovich^{1,2}, M.A. Khanchevskii^{1,2}, E.I. Kvasyuk^{1,2}, A.G. Sysa^{1,2}

¹Учреждение образования «Международный государственный экологический институт
имени А. Д. Сахарова» Белорусского государственного университета, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ
Минск, Республика Беларусь
yuridragonv@gmail.com

²Белорусский государственный университет, БГУ, г. Минск, Республика Беларусь

¹International Sakharov Environmental Institute of Belarusian State University, ISEI BSU
Minsk, Republic of Belarus

²Belarusian State University, BSU, Minsk, Republic of Belarus

В работе рассматривается одна из актуальных проблем – моделирование межмолекулярных взаимодействий биологически активных соединений ряда модифицированных нуклеотидов с ферментами репликации ДНК с использованием молекулярно-динамических подходов. В настоящей работе проведен молекулярный докинг взаимодействий фермента, участвующего в синтезе ДНК (ДНК-полимераза β) и лиганда (флударабина). Проанализированы результаты для полученных 80 систем, отобраны репрезентативные структуры комплексов на основе кластеризации и ранжирования по баллам результатов молекулярного докинга. Установлено, что в ходе докинга ДНК-полимеразы бета и флударабина возникает 5 водородных связей между аминокислотами Arg40, Arg183, Asp276 и Asp192 ДНК-полимеразы бета и атомами кислорода гидроксильных