

BIOTECHNOLOGY

VOL. 2, N2, 2009

BIMONTHLY

Редакційна колегія

Комісаренко Сергій Васильович
(головний редактор)
Стойка Ростислав Степанович
(заст. головного редактора)
Колибо Денис Володимирович
(заст. головного редактора)
Виноградова Олена Сергіївна
(відповідальний секретар)
Волков Георгій Леонідович
Гончар Михайло Васильович
Дзядевич Сергій Вікторович
Дробот Людмила Борисівна
Карпов Олександр Вікторович
Кунах Віктор Анатолійович
Левицький Євген Леонідович
Лукаш Любов Леонідівна
Мельничук Максим Дмитрович
Мінченко Олександр Григорович
Стародуб Микола Федорович
Товкач Федір Іванович
Філоненко Валерій Вікторович

Редакційна рада

Комісаренко Сергій Васильович
(голова)
Блюм Ярослав Борисович
Єгоров Олексій Михайлович (Росія)
Єльська Ганна Валентинівна
Кордюм Віталій Арнольдович
Кухар Валерій Павлович
Мірошников Анатолій Іванович (Росія)
Пастернак Чарльз (Великобританія)
Підгорський Валентин Степанович
Северин Євген Сергійович (Росія)
Сибірний Андрій Андрійович
Сидоров Володимир Анатолійович
(США)
Скрябін Костянтин Георгійович (Росія)
Созінов Олексій Олексійович
Широбоков Володимир Павлович

Адреса редакції:

Редакція журналу «Біотехнологія», вул. Леонтовича, 9, 01601, Київ, Україна
Телефон: (8-044) 235-14-72; E-mail: biotech@biochem.kiev.ua

*Свідоцтво про державну реєстрацію друкованого засобу масової інформації
серія КВ №10391 від 14.09.2005*

Постановою Президії ВАК України від 27.05.2009 №1-05/2 журнал внесено
до Переліку наукових фахових видань для публікації матеріалів
дисертаційних робіт за спеціальностями «Біохімія» та «Біотехнологія»

Науковий редактор Є. Л. Левицький
Літературний редактор Г. М. Шевченко

Комп'ютерний набір Л. П. Бабенко
Комп'ютерна верстка О. В. Мележик

Підписано до друку _____. Формат 210×297. Папір крейд. 115 г/м². Гарн. SchoolBookC.
Друк — офсетний. Обл.-вид. арк. 14,0. Наклад 200 прим. Замовлення 2/6.
Оригінал-макет підготовлено в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України;
друк — СПД Москаленко О.М., Київ, вул. Щорса, 31, к. 8,
тел.: (8-044) 228-23-13, (8-066) 716-55-44.

БІОТЕХНОЛОГІЯ

Науковий журнал

Виходить один раз на два місяці

БИОТЕХНОЛОГИЯ / BIOTECHNOLOGY

Том 2, №2, 2009

ОГЛЯДИ

Бардахівська К. І.
Гурина Н. М.
Кучмеровська Т. М.
Ніколаєв В. Г. Імуносорбція в лікуванні автоімунних захворювань . . .9

Борзова Н. В.
Варбанець Л. Д. Целюлозодеградуючі системи мікроорганізмів:
біосинтез, властивості та структурно-функціональні
особливості23

Борзова Н. В. Мікробні α -глюкозидази: класифікація, субстратна
специфічність та механізм дії42

Прилуцька С. В.
Ременяк О. В.
Гончаренко Ю. В.
Прилуцький Ю. І. Вуглецеві нанотрубки як новий клас матеріалів для
нанобіотехнології55

Барабой В. А. Фенольні сполуки виноградної лози: структура,
антиоксидантна активність, застосування67

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ СТАТТІ

Лабинцев А. Ю.
Олійник О. С.
Кабернюк А. А.
Чуніхін О. Ю.
Горчев В. Ф.
Курченко Т. О.
Чернишов В. І.
Колибо Д. В. Оптимізація умов синтезу кон'югатів протеїну А
з колоїдним золотом та розроблення підходів
для їх характеристики76

<i>Стежка В. А.</i> <i>Леоненко О. Б.</i> <i>Зінченко В. М.</i> <i>Матвєєва О. Ю.</i> <i>Мовчан В. О.</i>	Вплив наночастинок аморфного високодисперсного кремнезему на систему крові та прооксидантно-антиоксидантну рівновагу тканин щурів	84
<i>Мартинюк О. О.</i> <i>Наляж А. Г.</i> <i>Ван-Клей Д. Е.</i> <i>Мартинова-Ван-Клей О. В.</i>	Філогенетичний аналіз сиквенсів матурази <i>K</i> , рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилази (<i>rbcL</i>) та структури пилку представників родини <i>Amaranthaceae</i> Juss.	96
<i>Романько М. Є.</i>	Оцінювання ефектів стресу ліофілізації за інтенсивністю ліпопероксидації та окиснювальної модифікації протеїнів у мембранах клітин мікоплазм	103
<i>Гойстер О. С.</i> <i>Хмельницький Г. О.</i> <i>Дзядевич С. В.</i> <i>Назаренко В. І.</i> <i>Мінченко О. Г.</i>	Визначення Т-2 токсину за допомогою імуносенсора на основі поверхневого плазмонного резонансу	109
НОВИНИ		116
НОВІ ПУБЛІКАЦІЇ З БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА СУМІЖНИХ ДИСЦИПЛІН		128
КОНФЕРЕНЦІЇ, З'ЇЗДИ, СИМПОЗИУМИ, ВИСТАВКИ		135

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Бардахивская К. И.*
Гурина Н. М.
Кучмеровская Т. М.
Николаев В. Г. Иммуносорбция в лечении аутоиммунных заболеваний9
- Борзова Н. В.*
Варбанец Л. Д. Целлюлозодеградирующие системы микроорганизмов: биосинтез, свойства и структурно-функциональные особенности23
- Борзова Н. В.* Микробные α -глюкозидазы: классификация, субстратная специфичность и механизм действия . . .42
- Прилуцкая С. В.*
Ременяк О. В.
Гончаренко Ю. В.
Прилуцкий Ю. И. Углеродные нанотрубки как новый класс материалов для нанобиотехнологии55
- Барабой В. А.* Фенольные соединения виноградной лозы: структура, антиоксидантная активность, применение67

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Лабинцев А. Ю.*
Олейник О. С.
Кабернюк А. А.
Чунихин О. Ю.
Горчев В. Ф.
Курченко Т. О.
Чернышов В. И.
Колибо Д. В. Оптимизация условий синтеза конъюгатов протеина А с коллоидным золотом и разработка подходов для их характеристики76
- Стежка В. А.*
Леоненко О. Б.
Зинченко В. Н.
Матвеева А. Ю.
Мовчан В. А. Влияние наночастиц аморфного высокодисперсного кремнезема на систему крови и прооксидантно-антиоксидантное равновесие тканей крыс84
- Мартынюк О. А.*
Наляж А. Г.
Ван-Клей Д. Э.
Мартынова-Ван-Клей А. В. Филогенетический анализ сиквенсов матуразы *K*, рибулозо-1,5-дифосфаткарбоксилазы (*rbcL*) и структуры пыльцы представителей семейства *Amaranthaceae* Juss.96

<i>Романько М. Е.</i>	Оценка эффектов стресса лиофилизации по интенсивности липопероксидации и окислительной модификации протеинов в мембранах клеток микоплазм	103
<i>Гойстер О. С. Хмельницкий Г. А. Дзядевич С. В. Назаренко В. И. Минченко А. Г.</i>	Определение Т-2 токсина методом поверхностного плазмонного резонанса	109
НОВОСТИ		116
НОВЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО БИОТЕХНОЛОГИИ И СМЕЖНЫМ ДИСЦИПЛИНАМ		128
КОНФЕРЕНЦИИ, СЪЕЗДЫ, СИМПОЗИУМЫ, ВЫСТАВКИ		135

CONTENTS

REVIEWS

- Bardakhivska K. I.,
Gurina N. M.,
Kuchmerovska T. M.,
Nikolaev V. G.* Immunoabsorption for therapy
of autoimmune diseases9
- Borzova N. V.,
Varbanets L. D.* The cellulose degrading systems of microorganisms:
biosynthesis, properties structural and
functional characteristics23
- Borzova N. V.* Microbial α -glucosidases: classification, substrate
specificity and mechanism of action42
- Prylutska S. V.,
Remeniak O. V.,
Honcharenko Yu. V.,
Prylutskyy Yu. I.* Carbon nanotubes as a new class of materials for
nanobiotechnology55
- Baraboi V. A.* Grape phenols: structure, antioxidant activity
applications67

EXPERIMENTAL ARTICLES

- Labyntsev A. J.,
Oliinyk O. S.,
Kaberniuk A. A.,
Chunihin O. J.,
Gorchev V. F.,
Kyrchenko T. O.,
Chernushov V. I.,
Kolibo D. V.* Optimizing protein A-colloidal gold conjugates
synthesis conditions and developing approaches
for their characterization76
- Stezhka V. A.,
Leonenko O. B.,
Zinchenko V. H.,
Matveeva O. Yu.,
Movchan V. O.* Effect of nanoparticles of amorphous highly dispersed
SiO₂ on blood system and prooxidant-antioxidant
balance of the rats tissues84
- Martyniuk O. O.,
Nalian A. G.,
Van-Kley J. E.,
Martynova-Van-
Kley A. V.* Phylogenetic assay of maturase *K*, ribulose-bisphosphate
carboxylase (*rbcL*) sequences, and pollen structure
of representatives of the family *Amaranthaceae* Juss.96

<i>Romanko M. Ye.</i>	Estimation of lyophilization stress effects by according to lipoperoxidation intensity and of protein oxidative modification in mycoplasma cell membranes	103
<i>Gojster O. S.</i>		
<i>Khmelnitsky G. O.</i>	T-2 toxin determination of by surface	
<i>Dzyadevych S. V.</i>	plasmon resonance	109
<i>Nasarenko W. I.</i>		
<i>Minchenco O. H.</i>		
NEWS		116
NEW PUBLICATIONS ON BIOTECHNOLOGY AND ADJOINING BRANCHES OF SCIENCE		128
CONFERENCES, CONGRESSES, SYMPOSIA, EXHIBITIONS		135

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ СТАТТІ

УДК 577(087.1+112.4)

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ СИНТЕЗУ КОН'ЮГАТІВ ПРОТЕЇНУ А З КОЛОЇДНИМ ЗОЛОТОМ ТА РОЗРОБЛЕННЯ ПІДХОДІВ ДЛЯ ЇХ ХАРАКТЕРИСТИКИ

А. Ю. Лабинцев
О. С. Олійник
А. А. Кабернюк
О. Ю. Чуніхін
В. Ф. Горчев
Т. О. Курченко
В. І. Чернишов
Д. В. Колибо

Інститут біохімії ім. О.В.Палладіна НАН України, Київ

E-mail: lab.andrey@gmail.com

Оптимізовано метод отримання кон'югатів наночастинок золота з рекомбінантним фрагментом протеїну А *Staphylococcus aureus* для використання в імунохроматографічних тест-системах. Проаналізовано вплив основних компонентів реакційної суміші на розмір частинок золота та його кон'югатів з фрагментом протеїну А, їхню гомогенність, стабільність та ефективність розпізнавання імуноглобулінів. Запропоновано методи для швидко визначення розмірів синтезованих наночастинок золота з використанням оптичних характеристик. На основі одержаних результатів висунуто рекомендації щодо отримання кон'югатів наночастинок золота з фрагментом стафілококового протеїну А, які можна застосовувати у швидких імунохроматографічних тест-системах.

Ключові слова: наночастинки золота, протеїн А, *Staphylococcus aureus*, імуноглобулінзв'язувальна активність, імунохроматографічні тест-системи, електронна мікроскопія, лазерна кореляційна спектроскопія, спектрофотометрія, RGB-спектр.

Нанобіотехнологія — новітня галузь нанотехнології, що займається питаннями розроблення та використання наноматеріалів у біологічних дослідженнях та медицині. Одним з таких матеріалів є колоїди металів, які використовують для синтезу біокон'югатів наночастинок, отримання біосенсорних елементів для діагностики, доставлення біологічно активних речовин у клітину тощо [1].

Уперше кон'югати наночастинок золота почали застосовувати в електронній мікроскопії як маркери специфічних клітинних компартментів та клітинної локалізації певних біомолекул [2]. Здатність наночастинок міцно зв'язуватись із макромолекулами без втрати біологічних властивостей останніх [3], можливість створювати частинки різного розміру з метою візуалізації декількох компонентів клітини на одному препараті,

легкість детектування не лише в електронному та світловому мікроскопі, а й за відсутності допоміжних приладів, простота та невисока вартість виготовлення [4] свідчать про перспективність використання таких колоїдів у широкому спектрі біологічних досліджень. Перевагою наночастинок золота є також невибагливість до умов зберігання, оскільки вони не піддаються фотодеградації та достатньо стійкі не лише у колоїді, але й під час зберігання в сухому вигляді, нетоксичні, що робить їх зручними компонентами біосенсорних систем [5].

Одним із напрямів використання колоїдного золота є імунохімічні тести, які включають якісні та кількісні методи визначення вмісту певного антигену або антитіла у біологічній речовині, клітині або тканині. У такому разі як біоселективну молекулу для кон'югації з наночастинками золота зручно

використовувати стафілококовий протеїн А, який має імуноглобулінзв'язувальні властивості.

Протеїн А (SpA) — це секреторний білок масою 42 кДа, що продукується бактерією *Staphylococcus aureus*. У його структурі виділяють N-кінцевий сигнальний пептид S, п'ять гомологічних регіонів E, D, A, B, C, що складаються з 56–61 амінокислотних залишків [6] і утворюють схожі просторові структури у вигляді антипаралельно розташованих трьох α -спіралей [7], та C-кінцеву послідовність X, яка відповідає за зв'язування з клітинною стінкою бактерії [6]. Гомологічні регіони E, D, A, B, C SpA мають Ig-зв'язувальну здатність та взаємодіють з Fc γ -фрагментами та Fab-фрагментами важких ланцюгів V_H3-родини як розчинних антитіл, так і експонованих на поверхні В-лімфоцитів [8].

Для SpA є характерним вибіркоче зв'язування з імуноглобулінами різних видів. Так, він добре взаємодіє з 1, 2 та 4 підкласами IgG людини, 1 та 2 підкласами IgG мурчака, 2a та 2b підкласами IgG миші й імуноглобулінами всіх класів макаки резус, свині та кроля. Менш інтенсивно SpA взаємодіє з 1 та 3 підкласами IgG миші й імуноглобулінами всіх класів корови, собаки, коня, хом'ячка, вівці. Зв'язування IgM і IgA людини та IgM миші для SpA варіює [9, 10]. Визначення Fab-фрагментів за допомогою SpA не є ефективним [9].

Здатність SpA високоспецифічно взаємодіяти з антитілами на сьогодні широко використовують у біологічних дослідженнях. Так, на основі SpA та його рекомбінантних похідних виготовляють афінні сорбенти для швидкого і високоякісного очищення специфічних субкласів антитіл різних видів [10], створюють інструменти для аналізу вмісту антитіл та антигенів на поверхні клітин, ідентифікують антитілопродукуючі клітини [11], визначають імуноглобуліни в ІФА-аналізі й імуносенсорних системах.

Використана нами в роботі імунохроматографічна система ґрунтувалася на принципі латеральної протокової хроматографії, що працювала за таким принципом: на смужку хроматографічної нітроцелюлозної мембрани наносили антитіла, які проявляли розчином кон'югата наночастинок золота із SpA. Чутливість цього методу залежить від фізико-хімічних властивостей кон'югата наночастинок золота зі SpA і, зокрема, самого колоїдного золота, що входить до складу кон'югату.

Метою даної роботи було дослідити, як концентрація різних компонентів реакцій-

ної суміші впливає на характеристики синтезованих колоїдів наночастинок золота та їх кон'югатів зі SpA, а також підібрати методи для швидкого визначення основних характеристик колоїду. Створений кон'югат колоїдного золота зі SpA можна застосовувати для високочутливої візуалізації імуноглобулінів в імунохроматографії.

Матеріали і методи

Приготування зразків колоїдного золота

Для синтезу наночастинок колоїдного золота використовували натрійцитратний метод, заснований на відновленні цитратом натрію золотохлористоводневої кислоти [12]. Як допоміжні реагенти використовували розчини танінової кислоти та карбонату калію. У таблиці наведено склад різних варіантів реакційних сумішей, використаних для синтезу колоїдного золота. У кожному з випадків у різних пробірках попередньо нагрівали до 60 °C суміші (HAuCl₄ + H₂O) та (Na₃C₆H₅O₇ + K₂CO₃ + C₇₆H₅₂O₄₆), змішували їх та інкубували при 60 °C. Інкубацію проводили протягом часу, необхідного для появи забарвлення; відповідно, для проб №1–6 було достатньо 20 хв, пробу №7 інкубували впродовж 40 хв. Після цього пробірки інкубували при 0 °C та повністю охолоджували.

Кон'югація наночастинок колоїдного золота з рекомбінантним протеїном А

Процедура отримання рекомбінантного SpA була попередньо описана [13] і не відрізнялася від наведеної в даній роботі. Для кон'югації до синтезованих розчинів колоїдного золота додавали SpA у ЗФР (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na₂HPO₄, 0,024% KH₂PO₄, рН 7,4): 25 мкл 0,1%-го розчину SpA на 1 мл розчину колоїдного золота. Інкубували протягом 40 хв при 0 °C. Після цього в кожну з проб додавали 10 мг сироваткового альбуміну бика та витримували ще впродовж 20 хв. Щоб вилучити незв'язаний SpA, частинки золота осаджували центрифугуванням протягом 40 хв за 13 000 g. Після осадження надосадову рідину видаляли, а осад розчиняли в 1 мл 0,2%-го цитрату натрію, що містив 10 мг/мл сироваткового альбуміну бика.

Дослідження характеристик отриманих колоїдів та кон'югатів на їх основі з використанням електронної мікроскопії

Отримані колоїдні розчини та кон'югати на їх основі досліджували методами електронної мікроскопії з використанням приладу

Таблиця 1. Склад реакційних сумішей для синтезу різних варіантів колоїдного золота

Реагент №проби	1% -й водний розчин HAuCl ₄ , мкл	1% -й Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ , мкл	1% -й K ₂ CO ₃ , мкл	0,03% -й C ₇ H ₅ O ₄ (танінова кислота), мкл	H ₂ O, мкл
1	50	100	5	7,5	840
2	50	200	5	7,5	740
3	50	400	5	7,5	540
4	50	200	5	0	740
5	50	200	5	7,5	670
6	50	200	0	7,5	740
7	50	200	50	7,5	700

Hitachi H-600 (Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Японія). Для вимірювання діаметра синтезованих частинок, згідно з даними електронної мікроскопії, застосовували програмне забезпечення ImageJ v1.41o (NIH, USA). Кількість проаналізованих частинок колоїдного золота становила не менше 15 на пробу.

Дослідження характеристик отриманих колоїдів та кон'югатів на їх основі з використанням лазерної кореляційної спектроскопії

Для вивчення функції розподілу частинок за розміром використовували лазерний кореляційний спектрометр ZetaSizer-3 (Malvern Instrument, Великобританія). Метод ґрунтується на процесі розсіяння світла на будь-якому мікрооб'єкті, у даному випадку — наночастинках золота. У разі потрапляння на детектор вихідного та розсіяного світла виникає динамічна картина інтерференції, що притаманна для суми коливань з дуже близькими частотами, увесь інформаційний сигнал сконцентрувався в ділянці низьких частот, де його аналіз виконували за допомогою звичайних багатоканальних аналізаторів спектра. Розміри колоїдів золота вимірювали в оптичній скляній кюветі діаметром 10 мм у термостатованій лунці лазерного кореляційного спектрометра. Розсіяне випромінювання від гелійнеонового лазера ЛГ-111 потужністю 25 мВт та довжиною хвилі 633 нм вимірювали протягом 300–400 с та реєстрували на аналізаторі спектра multi computing correlator type 7032 се. Отриману автокореляційну функцію обробляли за допомогою комп'ютерної програми PCS-Size mode v1.52.

Спектрофотометричні дослідження та визначення RGB-координат отриманих колоїдів та кон'югатів на їх основі

Спектри поглинання колоїдів та їх кон'югатів отримували на спектрофотометрі СФ-

2000 (ОКБ «Спектр», Росія) у діапазоні хвиль 400–900 нм і визначали положення максимумів поглинання зразків, додатково вимірювали екстинкцію за 500 нм та 600 нм. Для одержання цифрових відбитків колоїдів та кон'югатів на їх основі досліджувані зразки вносили по 100 мкл у 96-лункову прозору планшету. З використанням сканера Epson Perfection 4990 Photo (Seiko Epson Corp., Японія) отримували цифрове зображення забарвлення кожної проби, з якого визначали RGB-координати зразка (за допомогою програмного забезпечення ImageJ v1.41o, NIH, USA).

Проведення імунохроматографічного аналізу

Для проведення імунохроматографічного аналізу було використано нітроцелюлозні мембрани Hi-Flow та набір для комплектації тест-систем Hi-Flow™ Plus Assembly Kit Plus (Millipore, США). До складу стрипу (тестової смужки), окрім нітроцелюлозної мембрани з іммобілізованими імуноглобулінами, входила також смужка для кон'югата колоїдного золота з протеїном А та адсорбуюча смужка, що вбирає надлишок вологи під час руху проби та кон'югата в товщі мембрани. Застосовували нітроцелюлозну мембрану розміром 5×30 мм. На смужку наносили 5 мкл розчину кон'югата колоїдного золота та висушували. Сироватки (в розведенні 1:100 та 1:1000 у ЗФР) наносили тонкою смугою, 30 хв витримували мембрану при 37 °С, після цього 30 хв у 5% -му розчині знежиреного молока в ЗФР, промивали та висушували. До нітроцелюлозної мембрани прикріплювали з одного боку смужку для кон'югата, з другого — адсорбуючу смужку таким чином, щоб вони на кілька міліметрів покривали нітроцелюлозну мембрану, після цього смужку для кон'югата покривали фільтрувальним папером. Для проведення аналізу стрип занурювали в ЗФР, за 10 хв фіксували появу червоної смуги, що з'являється внаслідок взаємодії між іммобілізованими на мембрані антитілами та кон'югованими

з наночастинками золота рекомбінантними фрагментами протеїну А, які рухаються в товщі мембрани.

Результати та обговорення

Проведення імунохроматографічних досліджень із застосуванням кон'югата протеїну А з колоїдними частинками металів потребує використання таких типів колоїдів, яким притаманні певні фізико-хімічні властивості. По-перше, колоїди повинні мати відповідний колір, який можна легко детектувати візуально (не лише в електронному та світловому мікроскопі, а й за відсутності допоміжних приладів) навіть за низьких концентрацій. По-друге, такі частинки мають якнайменше взаємодіяти з нітроцелюлозою поверхнею стрипа (не створювати фонового забарвлення). По-третє, вони повинні бути стабільними: мати низьку здатність до агрегації і зберігати свої оптичні та сорбційні властивості впродовж тривалого часу.

Змінюючи концентрації основних реагентів для приготування колоїдного золота, можна впливати на вихідні оптичні та адсорбційні властивості колоїду. Так, нами були синтезовані колоїди золота за сімома методиками синтезу (див. «Матеріали і методи») і кон'юговані з рекомбінантним SpA. Отримані наночастинки та їх кон'югати зі SpA було проаналізовано методами електронної мікроскопії, лазерної кореляційної спектроскопії, спектрофотометрії, а також проведено функціональні тести з метою виявлення найбільш оптимальної схеми синтезу колоїдів золота для імунохроматографії.

Аналіз проб синтезованого колоїдного золота методом електронної мікроскопії

Важливим фактором під час роботи з колоїдним золотом та його кон'югатами зі SpA є стандартизація умов одержання цих компонентів імунохроматографічної системи. Аналіз зразків колоїду методами електронної мікроскопії дав змогу визначити відмінності між пробами наночастинок золота, синтезованого за різними схемами, а також його кон'югатами зі SpA. Розмір частинок колоїдного золота суттєво залежав від концентрації компонентів реакційної суміші, що була використана для його синтезу (рис. 1). Так, проба № 4, що не містила танінової кислоти, мала найбільші за розміром колоїди (37 ± 10 нм). Додавання 7,5 мкл 0,03 %-ї танінової кислоти у пробі № 2 супроводжувалось зменшенням розміру части-

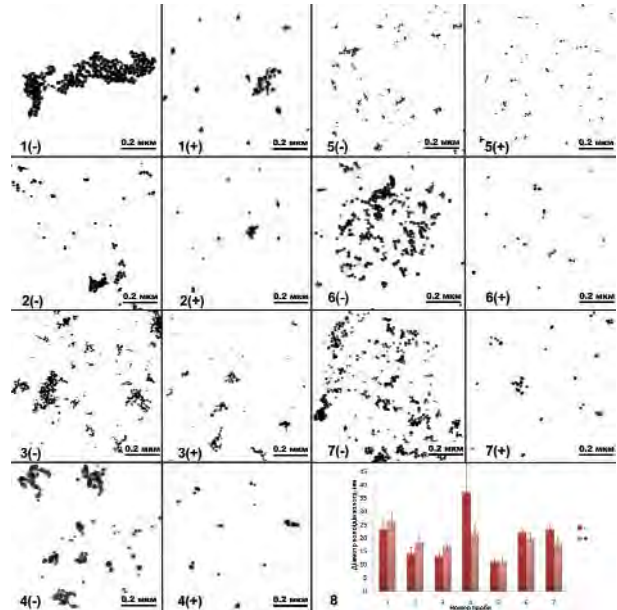


Рис. 1. Електронні мікрофотографії проб №№ 1–7 колоїдного золота [1(-)–7(-) відповідно] та кон'югатів проб №№ 1–7 колоїдного золота з протеїном А [1(+)-7(+)] відповідно].

На гістограмі 8 подано результати розрахунків середніх значень розміру частинок колоїдного золота в кожній пробі за даними електронної мікроскопії згідно з програмою ImageJ

нок золота (14 ± 2 нм); 10-кратний надлишок кислоти у пробі № 5 призвів до утворення найменших за розміром колоїдів (11 ± 1 нм). Вплив на розмір частинок золота також мав цитрат натрію: збільшення його концентрації від 0,1 % (проба №1) до 0,2 % (проба №2) та 0,4 % (проба № 3) під час приготування колоїду призводило до зменшення розміру часток від 23 ± 4 до 14 ± 2 та 13 ± 1 нм відповідно. Найменше впливав на розмір частинок карбонат калію, який, проте, за високої концентрації збільшував гетерогенність колоїду (22 ± 1 нм, 23 ± 3 нм у пробах № 6 та № 7 відповідно).

Як видно з електронних мікрофотографій, поданих на рис. 1, частинки колоїдного золота без протеїну А (проби позначено міткою «-») залежно від складу середовища синтезу мали різну здатність до утворення агрегатів [1(-)–7(-)]; кон'югація частинок зі SpA (проби позначено міткою «+») значно зменшувала розмір та кількість агрегатів [1(+)-7(+)]. У комплексі з протеїном також спостерігали зменшення гетерогенності частинок (рис 1.8). Отже, кон'югація золота зі SpA виступає як стабілізатор розміру колоїду та запобігає його агрегації.

Аналіз проб синтезованого колоїдного золота методом лазерної кореляційної спектроскопії

Як альтернативний метод визначення розмірів частинок колоїдного золота застосовували лазерну кореляційну спектроскопію. Цей метод дозволяє визначати розмір на основі інтерференційної картини світлорозсіювання. Використання лазерної кореляційної спектроскопії виявилось не оптимальним для даного дослідження, оскільки умови проведення вимірювань збігаються з умовами виникнення явища плазмонного резонансу у частинках золота [1]. Це явище може впливати на результати, отримані за допомогою даного приладу. Однак, визначаючи розмір частинок за положенням максимумів інтенсивності світлорозсіювання, можна було помітити певну відповідність (коефіцієнт достовірності апроксимації $R^2 = 0,81$) між цими вимірами і розмірами частинок, розрахованих за даними електронної мікроскопії (рис. 2).

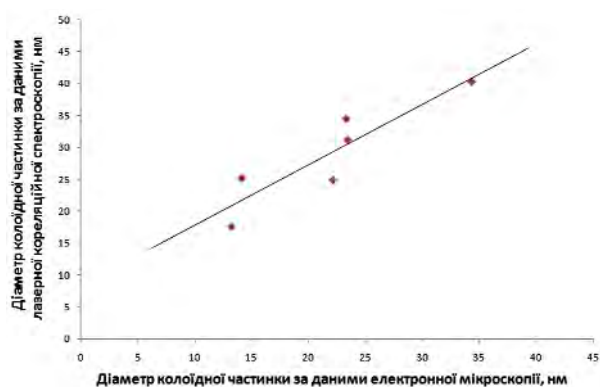


Рис 2. Порівняння розмірів частинок колоїдного золота за даними електронної мікроскопії та лазерної кореляційної спектроскопії

Аналіз проб синтезованого колоїдного золота методом спектрофотометрії

Дослідження спектральних характеристик колоїдів золота та їх кон'югатів зі SpA показали наявність характерного піка поглинання для колоїдів без SpA з максимумом у діапазоні 519–530 нм залежно від початкового складу реакційної суміші. Для колоїдів зі SpA максимум поглинання зміщувався в бік довгих хвиль на 4–12 нм і для більшості проб становив 533–534 нм (рис. 3, А). Порівняння даних спектрофотометрії та електронної мікроскопії показало, що положення максимуму поглинання залежить (коефіцієнт достовірності $R^2 = 0,98$) від роз-

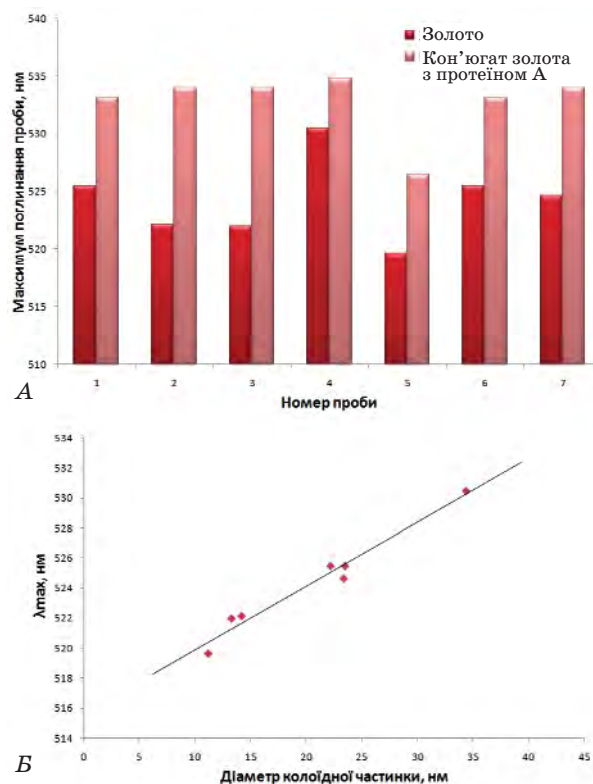


Рис. 3. Графічне порівняння положення максимумів поглинання проб колоїдного золота та кон'югатів цих проб з протеїном А (А). Співвідношення між розмірами частинок колоїдного золота та положеннями максимумів поглинання цих проб (Б)

мірів частинок золота (рис. 3, Б). Відповідно, розраховуючи максимум поглинання проби колоїдного золота, можна досить точно встановити середній розмір частинки колоїду. Таким чином, спектрофотометричний метод дозволяє швидко визначити розмір частинок золота, а отже і його придатність для синтезу кон'югата зі SpA.

Альтернативним методом розрахунку розміру колоїдів золота може бути визначення параметра α , що розраховується як співвідношення поглинання проби колоїду за довжини хвилі 500 нм до поглинання за довжини хвилі 600 нм. На рис. 4, А подано залежність між параметром α і розміром частинки золота.

Визначення розміру колоїдів у пробах синтезованих наночастинок золота методом визначення RGB-координат

Як альтернативний метод визначення розмірів частинок колоїдного золота використовують простіший за спектрофотометричний метод дослідження. За допомогою сканера отримують цифрові відбитки проб

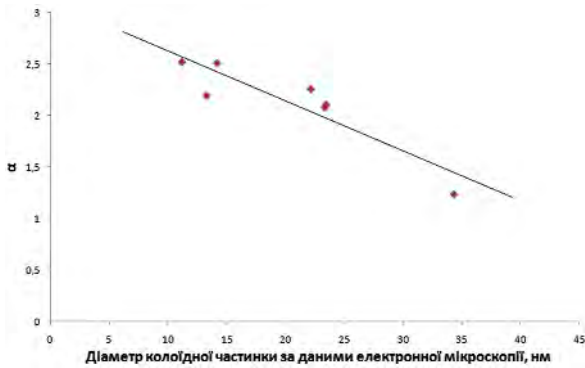


Рис. 4. Співвідношення між розмірами частинок колоїдного золота за даними електронної мікроскопії та коефіцієнтом α для кожної проби

колоїду (рис. 5, А) та розраховують їхню кольорову характеристику у координатах RGB (Red Green Blue) будь-яким графічним редактором, наприклад ImageJ. Оскільки поглинання за довжин хвиль 500 нм та 600 нм можна охарактеризувати як внесок червоного та синього кольору у характеристиці колоїду, то замість поглинання при 500 нм та 600 нм доцільно використовувати координату R (Red) та B (Blue) в його цифровому відбитку відповідно. Отже, співвідношення R/B буде близьким за значенням до параметра α (рис. 5, Б).

Функціональний тест колоїдів золота, кон'югованих з протеїном А. Методика синтезу колоїду впливає на цілу низку параметрів, які є важливими для роботи хроматографічного тесту: це оптичні характеристики самих наночастинок, їхній розмір та стабільність у розчині, ефективність кон'югації з протеїном. І, звичайно, отримані кон'югати можуть з різною ефективністю проявляти антитіла в імунохроматографічному тесті.

За результатами імунохроматографічного тесту усі кон'югати мали здатність розпізнавати антитіла (рис. 6, А). Однак у разі використання низької концентрації імуноглобулінів проби №1, №2, №4 та №7 за таких умов також давали чітку смугу, натомість кон'югати №3, №5 та №6 проявляли смугу ледь помітно (рис. 6, Б). Проби №1 та №4, незважаючи на достатньо яскраве проявлення смуги, характеризувалися двома суттєвими недоліками — утворенням осаду в розчині та тенденцією до формування фону в ході аналізу. В модельних умовах, коли антитіла були безпосередньо нанесені на нітроцелюлозу, варіанти №1 та №4 видаються досить ефективними, але їх використання в реальних умовах, коли на нітроцелюлозі міститься антиген, а сироватка з антитілами

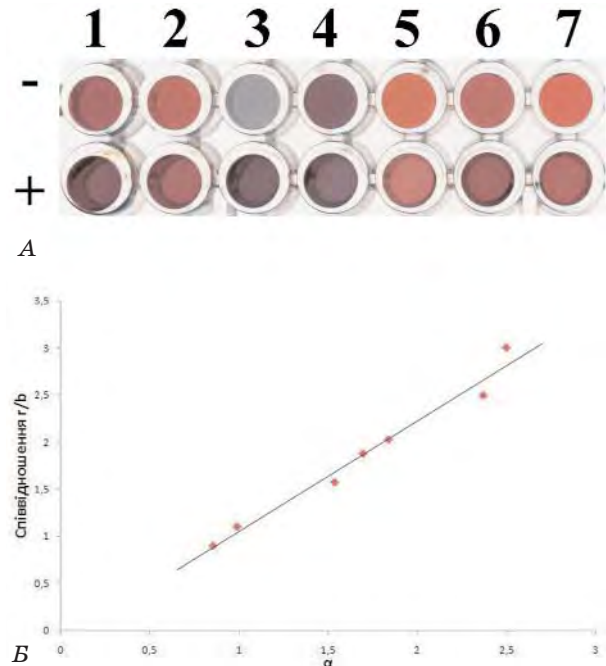


Рис. 5. Цифровий відбиток проб №№ 1–7 колоїдного золота [1(-)–7(-) відповідно] та кон'югатів проб №№ 1–7 колоїдного золота з білком А [1(+)-7(+)] відповідно, з якого визначалися координати RGB спектра (А). Порівняння коефіцієнта α , що розрахований за даними спектрофотометрії, та співвідношень координат R/B RGB спектра для кожного зразка (Б)

наноситься на подушечку з кон'югатом, є недоцільним. Адже зв'язування із сироватковими антитілами різної специфічності лише підсилить тенденцію до утворення значних за розміром конгломератів у товщі мембрани, створюючи фон, що є неприйнятним у роботі тест-системи.

Таким чином, нами було використано методики створення кон'югатів колоїдів золота з протеїном А, що мали найкращі характеристики в імунохроматографічних тестах. Для цього було створено та проаналізовано методами електронної мікроскопії, лазерної кореляційної спектроскопії та спектрофотометрії зразки колоїдів, що різнилися за вмістом основних, необхідних для синтезу, сполук. Встановлено, що колоїди золота, кон'юговані з протеїном А, стають більш стабільними в розчині. Показано, що збільшення концентрації танінової кислоти та цитрату натрію в середовищі синтезу колоїду зменшують розмір наночастинок, а зростання концентрації карбонату калію — гомогенність колоїду. Розраховано розмір частинок колоїдів за електронними

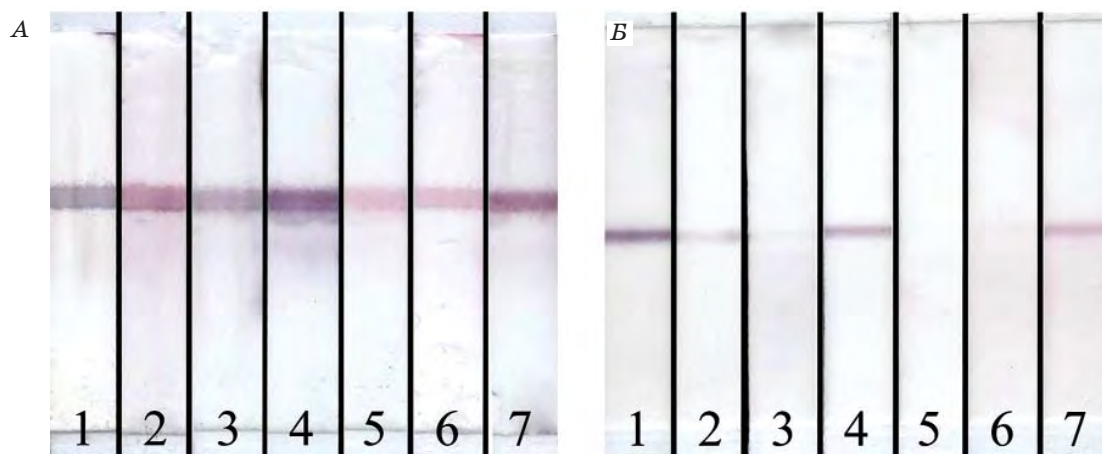


Рис. 6. Виявлення імуноглобулінів з використанням кон'югатів протеїну А та наночастинок колоїдного золота, отриманого за різними схемами синтезу (цифрами позначено відповідно номер проби):

А — стандартна концентрація імуноглобулінів (розведення 1:100),
 Б — зменшена концентрація імуноглобулінів (розведення 1:1000)

мікрофотографіями та запропоновано підходи до розрахунку розміру частинок золота за оптичними показниками проби. За результатами функціонального тесту показано відмінності в ефективності розпізнавання антитіл колоїдним золотом (створеним за різними методиками), кон'югованим з протеїном А. Колоїди, синтезовані за методиками 2 та 7, виявилися найбільш чутливими у

даному тесті. Наведені швидкі спектрофотометричні методи характеристики розмірів частинок можна застосовувати для стандартизації отриманих колоїдів золота. Підібрані умови синтезу наночастинок золота надалі можуть бути використані для виготовлення реагентів для високочутливих імунохроматографічних тестів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Papazoglou E. S., Parthasarathy A. BioNanotechnology. — Morgan & Claypool Publishers, 2007. — 150 p.
2. Faulk W. P., Taylor G. M. An immunocolloid method for the electron microscope // *Immunochemistry*. — 1971. — V. 8, N11. — P. 1081–1083.
3. Horisberger M. Colloidal gold: a cytochemical marker for light and fluorescent microscopy and for transmission and scanning electron microscopy // *Scan. Electr. Microsc.* — 1981. — Pt. 2, P. 9 — 31.
4. Horisberger M. Colloidal gold as a tool in molecular biology // *Trends Biochem. Sci.* — 1983. — V. 8, N11. — P. 395–397.
5. Sharma P., Brown S., Walter G. et al. Nanoparticles for bioimaging // *Adv. Coll. Interf. Sci.* — 2006. — V. 123 — 126. — P. 471–485.
6. Moks T., Abrahmsen L., Nilsson B. et al. Staphylococcal protein A consists of five IgG-binding domains // *Eur. J. Biochem.* — 1986. — V. 156, N3. — P. 637 — 643.
7. Graille M., Stura E. A., Corper A. L. et al. Crystal structure of a Staphylococcus aureus protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody: Structural basis for recognition of B-cell receptors and superantigen activity // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2000. — V. 97, N10. — P. 5399–5404.
8. Silverman G. J., Goodyear C. S. Confounding B-cell defences: lessons from a staphylococcal superantigen // *Nat. Rev. Immunol.* — 2006. — V. 6, N6. — P. 465–475.
9. Antibody Purification. Handbook // *Amer-sham Pharmacia Biotech*. — 2000. — P. 27–45.
10. Hober S., Nord K., Linhult M. Protein A chromatography for antibody purification // *J. Chromatogr. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. — 2007. — V. 848, N1. — P. 40–47.
11. Goding J.W. Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent // *J. Immunol. Meth.* — 1978. — V. 20. — P. 241–253.
12. Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspension // *Nat. Phys. Sci.* — 1973. — V. 241. — P. 20–22.
13. Олійник О. С., Колибо Д. В., Кабернюк А. А. та ін. Клонування та експресія функціонально активного фрагмента D-E-A-A* протеїну А *Staphylococcus aureus* // *Біотехнологія*. — 2009. — Т. 2, №1. — С. 59–68.

**ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ СИНТЕЗА
КОНЪЮГАТОВ ПРОТЕИНА А
С КОЛЛОИДНЫМ ЗОЛОТОМ
И РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ
ДЛЯ ИХ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

*А. Ю. Лабинцев
Е. С. Олейник
А. А. Кабернюк
А. Ю. Чунихин
В. Ф. Горчев
Т. А. Курченко
В. И. Чернышов
Д. В. Колибо*

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: lab.andrey@gmail.com

Оптимизирован метод получения конъюгатов наночастиц золота с рекомбинантным фрагментом протеина А *Staphylococcus aureus* для использования в иммунохроматографических тест-системах. Проанализировано влияние основных компонентов реакционной смеси на размер частиц золота и его конъюгатов с фрагментом протеина А, их гомогенность, стабильность и эффективность распознавания иммуноглобулинов. Предложены методы для быстрого определения размеров синтезированных наночастиц золота с использованием оптических характеристик. Выдвинуты рекомендации для получения конъюгатов наночастиц золота с фрагментом стафилококкового протеина А, которые можно применять в быстрых иммунохроматографических тест-системах.

Ключевые слова: наночастицы золота, протеин А, *Staphylococcus aureus*, иммуноглобулин-связывающая активность, иммунохроматографические тест-системы, электронная микроскопия, лазерная корреляционная спектроскопия, спектрофотометрия, RGB-спектр.

**OPTIMIZING PROTEIN A-COLLOIDAL
GOLD CONJUGATES SYNTHESIS
CONDITIONS AND DEVELOPING
APPROACHES
FOR THEIR CHARACTERIZATION**

*A. Yu. Labyntsev
O. S. Oliinyk
A. A. Kaberniuk
O. J. Chunihin
V. F. Gorchev
T. O. Kyrchenko
V. I. Chernushov
D. V. Kolibo*

Palladin Institute of Biochemistry of National
Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: lab.andrey@gmail.com

Approach for deriving conjugates of gold nanoparticles with *Staphylococcus aureus* protein A recombinant fragment for immunochromatographical test-systems was optimized. Influence of main components in reaction solution on particle size of gold and its conjugates with protein A fragment, their homogeneity, stability and immunoglobulin-recognition ability was investigated. Methods for rapid size determination of gold nanoparticles based on their optical characteristics were proposed. Recommendations for deriving staphylococcal protein A fragment-gold nanoparticle conjugates that could be successfully used in fast immunochromatographical test-systems were given.

Key words: gold nanoparticles, protein A, *Staphylococcus aureus*, immunoglobulin-recognition ability, immunochromatographical test-systems, electron microscopy, laser correlation spectroscopy, spectrophotometry, RGB spectrum.