

Bionanokompleksy nanocząstek złota z enzymami - zastosowanie w biosensorach

Bionanocomplexes of gold nanoparticles with enzymes - application in biosensors

Renata Wojnarowska-Nowak

Streszczenie

W ciągu ostatnich lat nanomateriały odgrywają coraz większe znaczenie zarówno w nauce, przemyśle, jak i medycynie. Szczególną grupę stanowią nanomateriały połączone z cząsteczkami biologicznymi, nazywane bionanomateriałami oraz bionanokompleksami. Dzięki swoim unikatowym właściwościom posiadają one niezwykle szerokie zastosowania biomedyczne, w tym w analityce, diagnostyce i nowoczesnych metodach terapii, co skłania do prowadzenia zaawansowanych prac w tym obszarze.

Przedmiotem niniejszej pracy było opracowanie technologii wytwarzania bionanokompleksów nanocząstek złota i enzymu oksydazy cholesterolowej oraz określenie ich właściwości umożliwiających wykorzystanie ich, jako aktywnego biologicznie elementu biosensora. Oksydaza cholesterolowa jest jednym z najważniejszych enzymów analitycznych, stosowana głównie w diagnostyce klinicznej do oznaczenia poziomu cholesterolu we krwi, ale również posiadająca szereg innych ważnych zastosowań. Wykorzystanie nanocząstek złota w konstrukcji bionanokompleksu skutkuje wywołaniem efektu powierzchniowo wzmocnionego rozproszenia ramanowskiego (SERS). Spektroskopia SERS jest techniką o niebywalej czułości, pozwalająca na badanie nawet pojedynczych cząsteczek.

Nanocząstki złota wykorzystane w procesie syntezy bionanokompleksu wytworzono z zastosowaniem metod chemicznych. Odpowiednio dobierając stężenia substratów

prorowadzonych reakcji uzyskano nanocząstki o określonej wielkości (w przedziale od 5 nm do 80 nm). Częsteczkami łącznikowymi pomiędzy nanocząstką, a enzymem były wybrane alkanotiole, o różnej długości łańcucha węglowego, z których najdłuższy linker MHDA dał najlepsze rezultaty wiązania enzymu, a przygotowane bionanokompleksy charakteryzowały się najwyższą aktywnością katalityczną. Scharakteryzowano właściwości optyczne bionanokompleksów. Określono położenie pasm absorpcji zarówno dla nanocząstek, jak i dla bionanokompleksów. Wykorzystując technikę spektroskopii podczerwieni kontrolowano proces syntezy bionanokompleksów na poszczególnych etapach ich przygotowywania, jak również dokonano charakterystyki strukturalnej otrzymanych produktów. Wykonano analizę widm oscylacyjnych oksydazy cholesterolowej w różnych środowiskach i formie - enzymu liofilizowanego, enzymu w buforze fosforanowym oraz immobilizowanego na powierzchni nanocząstek. Określono strukturę drugorzędową badanego białka i zidentyfikowano pojawiające się różnice.

Uzyskano efekt SERS dla bionanokompleksu nanocząstka złota - linker MHDA - oksydaza cholesterolowa. Analiza zarejestrowanych widm SERS pozwoliła na wyselekcjonowanie charakterystycznych linii markerowych. Stopień wzmocnienia sygnału zależny był od długości fali wzbudzającej oraz wielkości nanocząstek, na co wskazywały również wyniki przeprowadzonych symulacji rozkładu bliskiego pola. Przeprowadzone badania pozwoliły określić optymalną budowę bionanokompleksu, który posiada najlepsze właściwości użytkowe, z których najbardziej istotne to wysoka aktywność katalityczna i duży współczynnik wzmocnienia SERS. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że generowane jest wzmocnienie SERS, połączenie enzymu z nanocząstką jest stabilne, a aktywność enzymu została zachowana. Pozwala to na wykorzystanie przygotowanego materiału do celów analitycznych, w tym w konstrukcji biosensorów.

Abstract

In the past few years the nanomaterials have played an increasingly important role both in the world of science, in the industry, as well as, in the medicine. The nanomaterials connected with the biological molecules, referred to as the bionanomaterials and bionanocomplexes constitute as specific group. They have a wide biomedical use, due to their unique properties, mainly in the analytics, in the diagnostics and in the modern methods of the therapy, what encourages to conduct the advanced works in this field.

The subject of this work was to create a technology to produce bionanocomplexes of the gold nanoparticles and the cholesterol oxidase enzyme and to determine their properties enabling their usage as the biologically active element of the biosensor. The cholesterol oxidase is one of the most important analytical enzymes, used mainly in the clinical diagnostics to mark the cholesterol level in the blood, as well as having a large number of other uses. The use of the gold nanoparticles, in the construction of the bionanocomplex results in an surface enhanced Raman scattering effect (SERS). The SERS spectroscopy is a technique having great sensitivity, enabling to study even single molecules.

The gold nanoparticles, used in the process of the bionanocomplexes synthesis were produced with the use of the chemical methods. Properly choosing the substrates concentrations of the conducted reactions, the nanoparticles of a specific size were created (from 5 nm to 80 nm). Selected alkanethiols, with a different length of the carbon chain, among which the longest linker MHDA gave the best results of enzyme binding and the prepared bionanocomplexes were characterized by the highest catalytic activity, were the connecting molecules between the nanoparticles and the enzyme. The optical properties of the bionanocomplexes were characterized. The location of the absorption bands both for the nanoparticles as well as for the bionanocomplexes were identified. The infrared spectroscopy technique was used to monitoring the process of the bionanocomplexes synthesis on the particular stages of their preparation, as well as the structural characteristic of the received products was performed. The analysis of the vibrational spectra of the cholesterol oxidase in different environments and forms - lyophilized enzyme, the enzyme suspended in the phosphate buffer and the immobilized on the surface of the nanoparticles. The secondary structure of the cholesterol oxidase protein was examined and occurring differences were identified.

The SERS effect was obtained for the bionanocomplex: gold nanoparticles - MHDA linker - cholesterol oxidase. The analysis of the registered SERS spectra enabled to select the characteristic marker lines. The level of signal enhancement was depended on the excitation wavelength and on the size of the nanoparticles, what was indicated also in the results of the simulation of the near field distribution. The conducted studies enabled to specify the optimal construction of the bionanocomplex, which has the best usage qualities, among which the most significant is the high catalytic activity and the large SERS enhancement factor. Based on the achieved results, it can be stated, that the SERS enhancement is generated, the binding of the enzyme with the nanoparticles is stable and the enzyme activity was maintained. It allows to use the prepared material for the analytical purposes, including the construction of the biosensors.

[Recenzja - Prof. A. Kudelski](#)

[Recenzja - Prof. W. Kwiatek](#)