

Stabilność komponenta sieciującego warstwę receptorową biosensora po dodaniu nanocząstek złota

Aleksandra Kłos-Witkowska, Vasyl Martsenyuk

Akademia Techniczno-Humanistyczna w Bielsku-Białej, Wydział Budowy Maszyn i Informatyki, Katedra Informatyki i Automatyki, ul. Willowa 2, 43-300 Bielsko-Biała

Streszczenie: W pracy przeprowadzono badania stabilności składnika warstwy receptorowej biosensora po dodaniu nanocząstek złota. Wykazano przyspieszone zmiany konformacyjne pod wpływem Au. Obliczono względne procentowe zmiany w czasie między czystym białkiem a białkiem domieszkowanym Au. Wykazano, że z czasem zmiany te są większe i przekraczają 20 % w ostatnich dniach eksperymentu.

Słowa kluczowe: biosensor, nanocząstki Au, stabilność

1. Wprowadzenie

Biosensory są urządzeniami podatnymi na starzenie się; proces ten można zaobserwować jako spadek intensywności badanego sygnału. Stabilność biosensorów ma kluczowe znaczenie dla sukcesu komercyjnego, ponieważ biosensory są obecnie stosowane w coraz większej liczbie różnych zastosowań. Charakterystyka stabilności związana z okresem trwałości, możliwością wielokrotnego użycia oraz możliwością ciągłego wykorzystania jest często słabo zbadana i jest opisana w literaturze w małym zakresie, chociaż stanowi istotny czynnik wpływający na pracę urządzenia.

Mechanizmy starzenia się biosensora są złożone i do tej pory są one jeszcze słabo poznane. Wiadomo natomiast, że utrata stabilności biosensora jest sumą całkowitych zmian wpływających zarówno na użyty materiał biologiczny: na przykład: enzymy [1], przeciwciała [2], jak również na mediatora sygnału (np. błękitu pruskiego [3, 4]) czy też na materiał wiążący użyty w matrycy [5–8]. W literaturze naukowej związanej z biosensorem brak jest doniesień na temat wpływu, badanego w pracy czynnika (nanocząstek Au na komponent wiążący używany w warstwie receptorowej (Albuminę Surowicy Wołowej) BSA.

Celem przedstawionej pracy jest uzupełnienie i poszerzenie aktualnego stanu wiedzy na temat stabilności biosensora poprzez badania wpływu na materiał sieciujący (BSA) nanocząstek złota. Wyniki badań mogą być wykorzystane podczas konstrukcji biosensorów.

Autor korespondujący:

Aleksandra Kłos-Witkowska, awitkowska@ath.bielsko.pl

Artykuł recenzowany

nadesłany 08.02.2021 r., przyjęty do druku 16.03.2021 r.



Zezwala się na korzystanie z artykułu na warunkach licencji Creative Commons Uznanie autorstwa 3.0

2. Materiał i metoda

Do badań wykorzystano Albuminę Surowicy Bydłęcej (BSA) w postaci stałej (skryształizowany i liofilizowany proszek o czystości co najmniej 99 % – partia: SLBK3063V) i Au (zawiesinę stabilizowaną, partia: MKCD3520), o średnicy 10 nm. Wielkość nanocząstek Au 10 nm została wybrana z tego względu, że jest ona bardzo często stosowana w badaniach warstw receptorowych biosensorów ze względu na swoje właściwości fizyko-chemiczne [9–11].

Badano wodne roztwory białka i mieszaniny białko-Au. Badania przeprowadzono na roztworach wodnych, kierując się doniesieniami naukowymi [12], że taki roztwór pozwala lepiej poznać właściwości fizykochemiczne badanych substancji. Wykorzystując dwuwiązkowy spektrofotometr UV-Vis (Halo DB-20R) Dynamica, zbadano widma absorpcyjne wodnych roztworów BSA i mieszaniny BSA-Au w zakresie 250–320 nm. Zakres ten został dobrany w taki sposób, aby śledzić zmiany piku absorpcyjnym $\lambda_{\max} = 277$ nm pochodzącego od występujących w białku aminokwasów aromatycznych takich jak tryptofan (Trp), tyrozyna (Tyr) i fenyloalanina (Phe) [13].

Pomiary UV/VIS dla grupy kontrolnej (BSA 2 mg/ml) i mieszaniny BSA 2 mg/ml z 4 % Au przeprowadzono w ciągu 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22 dni w celu zbadania stabilności próbek w czasie.

Celem przeprowadzonego eksperymentu było poznanie odpowiedzi na pytanie, czy możliwe jest przedłużenie stabilności warstwy receptorowej przez aplikację czynników zewnętrznych (Au w niewielkim stężeniu) na białko, które odgrywa istotną rolę w procesie sieciowania w matrycy biosensora. Eksperyment został przeprowadzony w trzech niezależnych seriach pomiarowych, aby uniknąć przypadkowości w pomiarach.

3. Rezultaty i dyskusja

Na rysunku 1 przedstawiono widma absorpcyjne w zakresie 250–320 nm BSA (a) i mieszaniny BSA-Au (b) w 6, 18 i 22

dniu. Wykres pokazuje szeroki pik absorpcji ($\lambda_{\max} = 277 \text{ nm}$) pochodzący od występujący w białku aminokwasów aromatycznych, takich jak tryptofan (Trp), tyrozyna (Tyr) i fenylalanina (Phe).

Obserwacje wskazują na wzrost absorpcji wraz z wiekiem próbek. Zauważono również zmiany w kształcie widma. Z czasem widmo staje się bardziej rozmyte. Fakt ten można wytłumaczyć zmianami konformacyjnymi i denaturacją białka wraz z upływem czasu. Podczas procesu denaturacji albuminy wołowej zaburzona zostaje struktura 3-rzędowa białka, co z kolei może prowadzić do utraty aktywności biologicznej białka. W zależności od czynników zewnętrznych badane białko może ulec całkowitemu lub tylko częściowemu zniekształceniu [14]. Zmiany konformacyjne opisywane są przez różne formy albuminy (E, F, N, B, A). Najważniejsza jest forma N (*normal*/normalna), która zawiera 55 % helisy, forma F charakteryzuje się znacznie mniejszą rozpuszczalnością i zmniejszeniem zawartości struktury helisy. Badania wykazały, że po przyjęciu przez BSA formy F (*fast*) następuje gwałtowny wzrost lepkości wewnętrznej roztworów albumin, a badania mikroskopii elektronowej wykazały, że wzrasta ona również o 2/3 długości cząsteczki [15, 16]. Przy przejściu z formy F do formy E (ekspandowanej) helisa ulega zagięciu, a jej zawartość w tej formie wynosi tylko 35 %. Fałdowaniu ulega (10) helisa domeny I, która jest połączona z helisą (1) domeny II oraz helisa (10) domeny II połączona z helisą (1) domeny III [17].

Podczas przejmowania formy z N do B (*basic*/zasadowy), albumina zaczyna tracić swoją sztywność, a cząsteczka zaczyna zwiększać swój promień [18]. Wraz z upływem czasu docho-

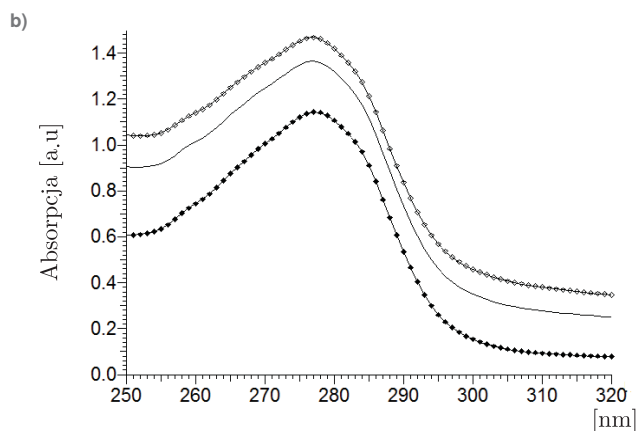
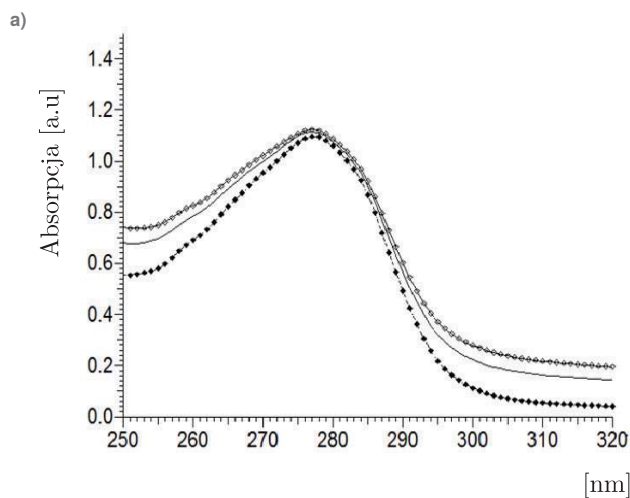
dzi do kolejnej izomeryzacji i albumina z formy B przyjmuje formę A (*aged*/dojrzały). W dalszej części pracy zajmujemy się przejściami konformacyjnymi między formą N (*normal*/normal) a formą A (*starzejąca się*/*old*).

Podczas procesu denaturacji oddziaływania elektrostatyczne mogą ulec zmianie [19]. Oddziaływania elektrostatyczne odgrywają istotną rolę w stabilizacji struktury przestrzennej makrocząsteczek.

Biorąc pod uwagę zasięg tego oddziaływania, wyróżnia się oddziaływania krótkiego ($< 5 \text{ \AA}$; 1 \AA (angstrom) = $0,1 \text{ nm}$) i dalekiego ($> 5 \text{ \AA}$) zasięgu. Do oddziaływań elektrostatycznych dalekiego zasięgu zalicza się oddziaływania typu jon-jon (mostek solny) lub dipol-jon. Oddziaływania te należą do stosunkowo silnych, ich siła wynosi od $40\text{--}400 \text{ kJ/mol}$. Oddziaływania bliskiego zasięgu nazywane są również oddziaływaniami van der Waalsa. Oddziaływania te są słabsze od oddziaływań dalekiego zasięgu. Przykładem oddziaływań bliskiego zasięgu w cząsteczce białka są zarówno siły wzajemnego przyciągania, jak i wzajemnego odpychania. Ze względu na fakt, że badania przeprowadzane są w roztworach wodnych, bardzo istotne dla konformacji badanego białka są również oddziaływania hydrofobowe. W przeprowadzonych eksperymentach (rys. 1), zaobserwowano asymetryczne poszerzenie piku (5 nm) od strony niższych długości fali, natomiast dla mieszaniny BSA-Au to poszerzenie jest mniej widoczne, najprawdopodobniej jest to konsekwencja właśnie tego typu oddziaływań. Oddziaływania hydrofobowe występują między resztami aminokwasowymi (Phe, Tyr, Trp) [7].

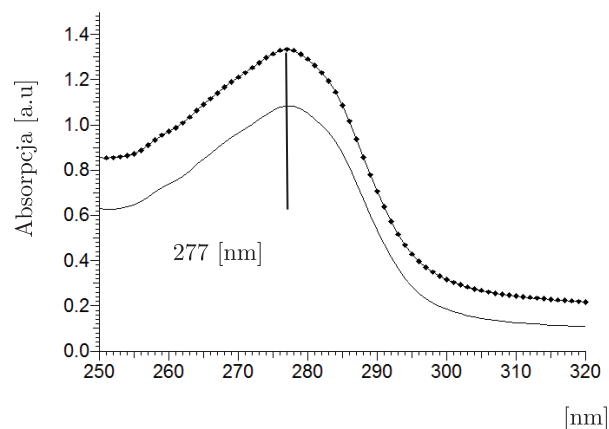
Jak widać na rys. 1b dodanie nanocząstek Au powoduje wzrost absorpcji roztworu. Zmiany te są bardzo niewielkie w pierwszych dniach eksperymentu i stają się coraz bardziej znaczące wraz z upływem czasu. Efekt ten może być związany ze zmianą wielkości cząstek po dodaniu nanocząstek Au do białka i tworzeniem kompleksów BSA-Au. Można zauważyć, że wartość absorpcji kompleksów BSA-Au jest większa niż BSA. Zatem denaturacja białka z dodatkiem Au jest szybsza niż samego białka. Zmiany te są bardziej znaczące w czasie.

Rysunek 2 przedstawia widmo UV/Vis w 15. dniu trwania eksperymentu, dla BSA (linia z krzyżykami) oraz dla kompleksu BSA-Au (linia gładka). Cylindryczne piki absorpcyjne w zakresie $250\text{--}300 \text{ nm}$ ($\lambda_{\max} = 277 \text{ nm}$), spowodowane są przejściem $\pi \rightarrow \pi^*$ reszt aminokwasów aromatycznych takich jak tyrozyna (Tyr), fenylalanina (Phe) i tryptofan (Trp) specjalnie (Tyr) i (Trp). Reszty te mają w swojej budowie pierścień ze sprzężonym układem węglowych wiązań podwójnych typu π ,



Rys. 1. Widma UV/Vis próbek kontrolnych (a) i kompleksów BSA-Au (b) w 6 dniu (pełne kwadraty), w 18 dniu (gładka), w 22 dniu (puste kwadraty)

Fig. 1. UV/Vis spectrum of control samples (a), and BSA-Au complexes (b) for 6 day (full squares), 18 day (smooth), 22 day (empty squares)



Rys. 2. Widma UV/Vis w 15. dniu, dla BSA (gładka) oraz kompleksów BSA-Au (pełne kwadraty)

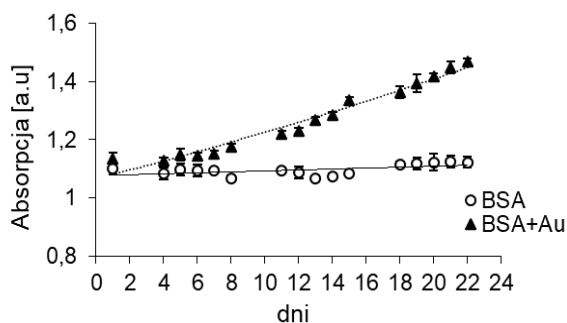
Fig. 2. UV / Vis spectrum on day 15, for the BSA (smooth) for the BSA-Au complex (full squares)

co powoduje zmniejszenie różnicy energii pomiędzy poziomami π i π^* oraz zwiększenie prawdopodobieństwa przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$ [8]. Poniższy wykres przedstawia absorpcję w 15. dniu eksperymentu. Widać, że dla mieszaniny BSA-Au ma ona większą wartość niż dla BSA.

Powszechnie wiadomo, że absorpcja w BSA wzrasta z czasem z powodu procesu denaturacji [19, 20], więc można założyć, że zmiany konformacyjne zachodzą szybciej w kompleksach BSA-Au niż w BSA. Dokładny i szczegółowy mechanizm wiązania pomiędzy BSA i Au jest nadal przedmiotem badań [21, 22], jednakże autorzy [23] uważają, że dla małych stężeń Au reszty białkowe reagują z hydronami w roztworze, pozostawiając złoto z tendencją do agregacji. Proces ten jest widoczny na rys. 2, gdzie można zauważyć większą absorpcję dla kompleksów niż dla czystego BSA.

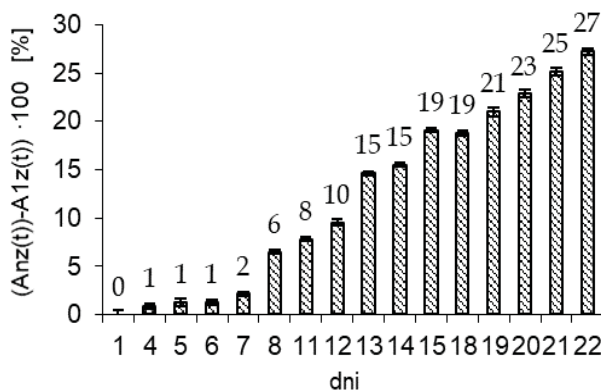
Rysunek 3 przedstawia zmiany w czasie absorpcji dla BSA i kompleksów BSA-Au. Można zauważyć, że zmiany wartości absorpcji zachodzą mniej dynamicznie dla BSA, a bardziej dynamicznie dla kompleksów BSA-Au. Co więcej, wraz z upływem czasu różnice stają się coraz wyraźniejsze. Fakt ten może być związany z utratą stabilizacji łańcucha polipeptydowego na skutek osłabienia oddziaływań elektrostatycznych (sił van der Waalsa) [24].

Z czasem oddziaływania te ulegają osłabieniu w wyniku procesu denaturacji. Grupy aminokwasów aromatycznych (Phe, Tyr, Trp) stają się bardziej wyeksponowane i podatne na oddziaływania hydrofobowe. Skutkuje to zmianami konformacyjnymi i obniżeniem aktywności biologicznej białka. W przypadku kompleksów BSA-Au zmiany te zachodzą szybciej. Względne zmiany procentowe między kompleksem BSA-Au a czystym BSA przedstawiono na rys. 4. Obliczenia wykonano za pomocą formuły (1).



Rys. 3. Wartość absorpcji w kolejnych dniach dla BSA oraz kompleksu BSA-Au

Fig. 3. Absorption on following days for BSA and for BSA-Au



Rys. 4. Względne zmiany w absorpcji w kolejnych dniach między absorpcją kompleksu BSA-Au a absorpcją BSA

Fig. 4. Relative changes in absorption in the following days between absorption in BSA-Au complexes and absorption in BSA

$$[Anz(t) - A1z(t)] = (Any - A1y) - (Anx - A1x) \quad (1)$$

gdzie: Any – absorpcja kompleksu BSA-Au w kolejnych dniach, A1y – absorpcja kompleksu BSA-Au w pierwszym dniu, Anx – absorpcja BSA w kolejnych dniach, A1x – absorpcja BSA w pierwszym dniu, Anz(t) – zmiana absorpcji kompleksu BSA-Au w czasie, A1z(t) – zmiana absorpcji BSA w czasie.

Analizując rys. 4 można zauważyć, że w dniach od 1. do 7. względne różnice w absorpcji są niewielkie i osiągają maksymalnie 2 %. Wraz z upływem czasu różnice stają się coraz wyraźniejsze i tak między 8 a 18 dniem przyjmują wartości od 6 % do 19 %. Największe różnice procentowe zaobserwowano w ostatnich dniach eksperymentu (19–22 dzień) i wynoszą one ponad 20 %.

Podsumowanie

Podsumowując, w prezentowanej pracy wykazano wpływ niskiego stężenia nanocząstek złota na stabilność komponenta sieciującego warstw receptorowych biosensorów. Zaobserwowano przyspieszone zmiany denaturacji po dodaniu nanocząstek złota w małym stężeniu. Badania stabilności w czasie wykazały spadek stabilności białka w czasie, szybszą utratę stabilności białka w wyniku zastosowania nanocząstek złota o niskim stężeniu. Obliczono względne procentowe zmiany w czasie między czystym białkiem a białkiem domieszkowanym Au. Wykazano, że z czasem zmiany te są większe i przekraczają 20 % w ostatnich dniach eksperymentu.

Bibliografia

- Martsenyuk V., Klos-Witkowska A., Sverstiuk A., *Stability, bifurcation and transition to chaos in a model of immunosensor based on lattice differential equations with delay*. "Electronic Journal of Qualitative Theory of Differential Equations", Vol. 27, 2018, 1–31.
- Klos-Witkowska A., *Biosensory*, „Pomiary Automatyka Robotyka”, R. 19, Nr 3, 2015, 37–40, DOI: 10.14313/PAR_217/37.
- Mosinska L., Fabisiak K., Paprocki K., Kowalska M., Popielarski P., Szybowicz M., Stasiak A., *Diamond as a transducer material for the production of biosensors*. „Przemysł Chemiczny”. Vol. 92, Nr 6, 2013, 919–923.
- Shrisha N., Jain A., Jain A., Sarika C., Rekha, K., Narasimha Murthy B., *Studies on enhancing operational stability of a reusable laccase-based biosensor probe for detection of ortho-substituted phenolic derivatives*. “3 Biotech”, Vol. 5, 2015, 911–924, DOI: 10.1007/s13205-015-0292-7.
- Ertürk G., Berillo D., Hedström M., Mattiasson, B., *Microcontact-BSA imprinted capacitive biosensor for real-time, sensitive and selective detection of BSA*, “Biotechnology Reports”, Vol. 3, 2015, 65–72, DOI: 10.1016/j.btre.2014.06.006.
- Lin CH., Lee M., Lee W., *Bovine serum albumin detection and quantitation based on capacitance measurements of liquid crystals*. “Applied Physics Letters”, Vol. 109, No. 9, 2016, DOI: 10.1063/1.4962169.
- Yu J., Chen Y., Xiong L., Zhang X., Zheng Y., *Conductance Changes in Bovine Serum Albumin Caused by Drug-Binding Triggered Structural Transitions*. “Materials” (Basel), Vol. 12, No. 7, 2019, DOI: 10.3390/ma12071022.
- Taked K., Wada A., Yamamoto K., Moriyama Y., Aoki K., *Conformational change of bovine serum albumin by heat treatment*. “Journal of Protein Chemistry”, Vol. 8, No. 5, 1989, 653–659, DOI: 10.1007/BF01025605.
- Wang J., Profitt JA., Pugia MJ., Suni II., *Au nanoparticle conjugation for impedance and capacitance signal amplification in biosensors*. “Analytical Chemistry”, Vol. 78, No. 6, 2006, 1769–1773, DOI: 10.1021/ac051113+.

10. Lismont M., Dreesen L., *Comparative study of Ag and Au nanoparticles biosensors based on surface plasmon resonance phenomenon*. "Materials Science and Engineering: C", Vol. 32, No. 6, 2012, 1437–1442, DOI: 10.1016/j.msec.2012.04.023.
11. Young M., Seung O., Insoo K., Ki Y., Duchang H., Dong-Goo K., *Detection of Biomarkers Using LSPR Substrate with Gold Nanoparticle Array*. "Journal of Nanomaterials", Vol. 2015, DOI: 10.1155/2015/302816.
12. Michnik A., Michalik K., Drzazga Z., *Effect of UVC radiation on conformational restructuring of human serum albumin*. "Journal of Photochemistry and Photobiology, B. Biology", Vol. 90, No. 3, 2008, 170–178, DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2007.12.007.
13. Hongliang X., Nannan Y., Haoran X., Tiansh W., Guiying, L., Zhengqiang L., *Characterization of the Interaction between Eupatorin and Bovine Serum Albumin by Spectroscopic and Molecular Modeling Methods*. "International Journal of Molecular Sciences", Vol. 14, No. 7, 2013, 14185–14203, DOI: 10.3390/ijms140714185.
14. Berg S., Vile M., *Biologia*. Eds. Mutlico, Oficyna Wydawnicza, Warszawa 2000.
15. Harfenist E., Murry R., *Biochemia Harpera*, ed. PZWL, Warszawa 1982.
16. Jakubke H., Keit H., *Aminokwasy, peptydy, białka*, PWN, Warszawa 1982.
17. Michnik A., Michalik, K., Drzazga Z., *Stability of Bovine Serum Albumin at different pH*. "Journal of Thermal Analysis and Calorimetry", Vol. 80, 2005, 399–406, DOI: 10.1007/s10973-005-0667-9.
18. Barbosa L., Ortore M., Spinozzi F., Mariani, P., Bernstoff S., *The Importance of Protein-Protein Interactions on the pH-Induced Conformational Changes of Bovine Serum Albumin: A Small-Angle X-Ray Scattering Study*, "Biophysical Journal", Vol. 98, No. 1, 2010, 147–157, DOI: 10.1016/j.bpj.2009.09.056.
19. Klos-Witkowska A., Martsenyuk V., *Investigation of biosensor potential component stability caused by influence of external condition*. "Ecological Chemistry and Engineering S", Vol. 26, No. 4, 2019, 665–674, DOI: 10.1515/eces-2019-0048.
20. Klos-Witkowska A., *Influence of Fractional Electromagnetic Radiation Doses on Biosensor Matrix Component Stability*. "Acta Physica Polonica A", Vol. 133, No. 1, 2018, 101–104, DOI: 10.12693/APhysPolA.133.101.
21. Pan B., Cui D., Xu P., Li Q., Huang T., He R., Gao F., *Study on interaction between gold nanorod and bovine serum albumin*. "Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects", Vol. 295, No. 1–3, 2007, 217–222, DOI: 10.1016/j.colsurfa.2006.09.002.
22. Ravindran A., Singh A., Raichur A., Chandrasekaran N., *Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA)*, "Colloids and Surfaces B: Biointerfaces", Vol. 76, No. 1, 2010, 32–37, DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.10.005.
23. Nghiem T., Nguyen T., Fort E., Nguyen P., Hoang T., Nguyen T., Tran H., *Capping and in vivo toxicity studies of gold nanoparticles*. "Advances in Natural Science: Nanoscience and Nanotechnology", Vol. 3, 2012, DOI: 10.1088/2043-6262/3/1/015002.
24. Sochacka J., Pacholczyk M., Wójcik P., *Sposoby graficznej prezentacji wyników dokowania molekularnego uzyskanych za pomocą dedykowanych programów komputerowych, Trendy i rozwiązania technologiczne – odpowiedź na potrzeby współczesnego społeczeństwa*. Tom 1. 81–101 Lublin 2017.

Stability of the Cross Linking Component of the Biosensor Receptor Layer After Addition of Gold Nanoparticles

Abstract: In this study, the stability of the receptor layer component of a biosensor after addition of gold nanoparticles was investigated. Accelerated conformational changes under the influence of Au were demonstrated. The relative percentage changes over time between the pure protein and the Au doped protein were calculated. It was shown that these changes are greater with time and exceed 20 % in the last days of the experiment.

Keywords: biosensor, Au nanoparticles, stability

dr Aleksandra Klos-Witkowska

awitkowska@ath.bielsko.pl

ORCID: 0000-0003-2319-5974

Adiunkt w Katedrze Informatyki i Automatyki na Wydziale Budowy Maszyn i Informatyki Akademii Techniczno-Humanistycznej w Bielsku-Białej. Zainteresowania naukowe: sensory i biosensory.



prof. dr hab. Vasyl Martsenyuk

vmartsenyuk@ath.bielsko.pl

ORCID: 0000-0001-5622-1038

Profesor w Katedrze Informatyki i Automatyki na Wydziale Budowy Maszyn i Informatyki Akademii Techniczno-Humanistycznej w Bielsku-Białej. Zainteresowania naukowe: biosensor, systemy dynamiczne, informatyka medyczna.

