

УДК 621.3.682.5

МОЛЕКУЛЯРНА БІОФІЗИКА

РЕЄСТРАЦІЯ БІОМОЛЕКУЛ МАЛИХ РОЗМІРІВ МЕТОДОМ  
ПОВЕРХНЕВОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСУВ.І.Чегель<sup>1</sup>, С.О.Пілецький<sup>2</sup>, О.В.Пілецька<sup>2</sup>

- 1) Інститут фізики напівпровідників Національної Академії Наук, 252650 Київ-28, пр.Науки, 45  
 2) Інститут молекулярної біології та генетики Національної Академії Наук, 252143, Київ, пр.Заболотного, 150.  
 Надійшла до редакції: 24 грудня 1998 року

Показана можливість використання поверхневого плазмонного резонансу (ППР) для реєстрації органічних молекул з малою молекулярною масою ( $\approx 200$  дальтон) на прикладі гербіцидів атразину та метрибузину. ППР-реєстрація вказаних гербіцидів базується на використанні рослинного білку D1, який є природним рецептором для гербіцидів, що інгібують процес біосинтезу. Чутливість, що досягнута для двох запропонованих вимірювальних схем, сягає 100 нг/мл та 0.1 нг/мл, відповідно. Описуються особливості методики та технології, що пов'язані з реєстрацією органічних молекул з малою молекулярною масою та використанням ППР.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** гербіциди, поверхневий плазмонний резонанс, біосенсор.

В останні роки метод ППР затвердився як один з основних методів при дослідженні біомолекулярних взаємодій [1]. Серед переваг цього методу є висока чутливість, можливість спостереження за кінетикою біологічних реакцій в реальному вимірі часу та в природному для молекул середовищі, можливість обійтися без попередньої молекулярної мітки. В той же час існують деякі обмеження для методу, пов'язані з розмірами досліджуваних об'єктів. Так, спостереження молекул з масою меншою ніж 200 дальтон є практично неможливим з використанням звичайної схеми реєстрації.

Для вирішення цієї проблеми ми пропонуємо два підходи, які базуються на наявній можливості специфічного зв'язку між молекулою з малою молекулярною масою, що реєструється, та великою молекулою. Ці підходи ілюструються на прикладі реєстрації гербіцидів за допомогою рослинного білку D1, який ще називають гербіцид-зв'язуючим білком, одержаним з хлоропластових мембран. Механізм дії гербіциду базується на заміщенні ним пластохінону, який є вторинним акцептором електронів в реакційному центрі фотосистеми II, що призводить до зупинки переміщення електронів між фотосистемами з послідовним припиненням життєдіяльності рослини [2]. Молекулярна маса більшості гербіцидів коливається в межах 190-250 дальтон, що робить їх реєстрацію з використанням ППР проблематичною. В першій методиці молекула гербіциду, атразин, проникає в шар білку D1, адсорбованого на поверхні золота і заміщує пластохінон, молекулярна маса якого 750 дальтон. Реакція заміщення змінює діелектричні характеристики молекулярного комплексу, що реєструється приладом. Зміщення кута плазмонного резонансу (ППР-сигнал) при цьому пропорціональне концентрації гербіциду в розчині. Другу методику можна назвати конкурентною, тут молекула гербіциду з малою молекулярною масою (в нашому випадку це метрабузин) закріплюється на чутливій поверхні сенсора і конкурує з вільною молекулою метрабузину за зв'язування з білком D1 в розчині. Для поліпшення умов взаємодії з білком, гербіцид закріплювався на поверхні з використанням молекулярного ланцюжка, який складався із сімнадцяти атомів вуглецю. З метою прискорення реакції зв'язування, пластохінон з білку D1 був екстрагований. Під час реєстрації розчин білку D1 інкубувався з різними концентраціями метрабузину. ППР-сигнал при цій методиці є зворотнім до концентрації вільного гербіциду в розчині.

## ТЕОРЕТИЧНІ АСПЕКТИ

Поверхневий плазмон (ПП) являє собою хвилю густини заряду, хвильовий вектор якої направлений вздовж границі розподілу між металом чи напівпровідником та середовищем, а амплітуда напруженості поля експоненційно затухає при віддаленні від границі розділу. Подібна хвиля може бути збуджена зокрема, на зовнішній поверхні тонкої плівки металу з достатньо великою негативною та невеликою уявною частинами комплексної діелектричної функції [3]. Для збудження ПП звичайно використовуються тонкі плівки золота та срібла. Рівняння дисперсії для поверхневого плазмону, що розповсюджується вздовж тонкої плівки металу з комплексною діелектричною функцією  $\epsilon(\omega)$  та середовищем з діелектричною функцією  $\epsilon_c$  має вигляд [3]:

$$k_m = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon(\omega)\epsilon_c}{\epsilon_c + \epsilon(\omega)}} \quad (1)$$



де  $k_{np}$  - хвильовий вектор плазмону,  $c$  - швидкість,  $\omega$  - частота світла. Поверхневий плазмон не може бути збуджений прямим падаючим світлом з середовища з меншою густиною, в силу того, що величина хвильового вектора для фотона  $k_c = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_c}$  є недостатня. Для збільшення величини хвильового вектора

падаючого світла (виконання закону збереження компоненти хвильового вектора, паралельної границі розподілу) використовують метод ППВВ (порушене повне внутрішнє відбиття). Найчастіше використовується схема експерименту в геометрії Кретчмана [4] (Рис.1), при якій плівка металу розміщена безпосередньо на призмі з високим коефіцієнтом заломлення  $\sqrt{\epsilon_n} > \sqrt{\epsilon_c}$  або на скляній

пластинці, що має оптичний контакт з призмою завдяки рідині. В методі ППВВ світло падає на границю розподілу між середовищами при кутах, що більше критичного  $\theta_k$ . При цьому спостерігається повне внутрішнє відбиття світла  $R \rightarrow 1$ . Однак, частина світла все-таки проникає на зовнішню сторону призми (затухаюча хвиля) і збуджує в металі плазмон. При цьому плівки використовують такі, щоб потік енергії досягав границі розподілу метал-середовище. Відповідно до теорії, ППР виникає в випадку, коли  $k_x = k_{np}$ , що досягається зміною кутів падіння в інтервалі між  $\theta_k < \theta < 90^\circ$  і реєструється, як мінімум в графіку інтенсивності відбитого р-поляризованого світла  $R(\theta)$  (далі-крива ППР, Рис. 2, крива 1). Мінімуму інтенсивності відповідає резонансний кут  $\theta_{min}$ , який може бути визначений з рівняння:

$$\sqrt{\epsilon_c} \sin \theta_{min} \approx \sqrt{\frac{\epsilon'(\omega)\epsilon_c}{\epsilon_c + \epsilon''(\omega)}} \quad (2)$$

в якому ми використовуємо тільки реальну частину комплексної діелектричної функції  $\epsilon(\omega) = \epsilon'(\omega) + i\epsilon''(\omega)$ . Звичайно, поверхневий плазмон не може існувати без затухання в плівці металу і  $\epsilon''(\omega) \neq 0$ , але в більшості випадків  $|\epsilon'(\omega)| \gg |\epsilon''(\omega)|$ . Розміщення на поверхні металу діелектричного покриття, наприклад, у вигляді адсорбованих біомолекул, викликає зростання величини вектора поверхневого плазмону:

$$k_{np}^1 = k_{np}^0 + \Delta k_{np}$$

Відповідно до рівняння (2) це викличе зміщення положення мінімуму кривої ППР (Рис.2, крива 2). Розраховуючи зміщення  $d\theta$  з використанням формул Френеля, стає можливим оцінити оптичну товщину шару біомолекул. Для розрахунку ефективного коефіцієнта заломлення  $n_{ef}$  молекулярного шару необхідно зробити підсумовування поляризованостей складаючих його частин згідно рівняння Лорентц-Лоренца [3].

$$\frac{n_{ef}^2 - 1}{n_{ef}^2 + 2} = \frac{n_{mol}^2 - 1}{n_{mol}^2 + 2} V + \frac{n_c^2 - 1}{n_c^2 + 2} (1 - V) \quad (3)$$

де  $n_{mol}$  - коефіцієнт заломлення молекул,  $n_c$  - коефіцієнт заломлення середовища, в якому молекули знаходяться,  $V$  - фактор заповнення, що визначається формою молекул.

Мінімальна величина зміщення положення мінімуму ППР-кривої обмежується можливостями реєструючого обладнання і в більшості випадків знаходиться близько  $0.005^\circ$ . Відповідно до рівняння (3), ефективний коефіцієнт заломлення щільно запакованого моношару біомолекул сферичної форми в водному середовищі  $n_{ef} = 1.36$ , і є можливим розрахувати оптичну товщину шару, що викликає таке зміщення. Її величина не перевищує 0.05 нм і залежить від щільності пакування. Знаючи молекулярну вагу відповідної молекули і вважаючи її форму сферичною, легко розрахувати товщину моношару біомолекул, що реєструються. Так, для гербіцидів вона буде в межах 0.8-1 нм. Розрахунки показують, що сорбція такого моношару викличе зміщення положення мінімуму ППР-кривої менше ніж  $0.05^\circ$ , що знаходиться близько нижньої межі чутливості ППР-методу. Проте, при реєстрації малих концентрацій щільність пакування біомолекул в сорбційному шарі, і, відповідно, величина зміщення положення

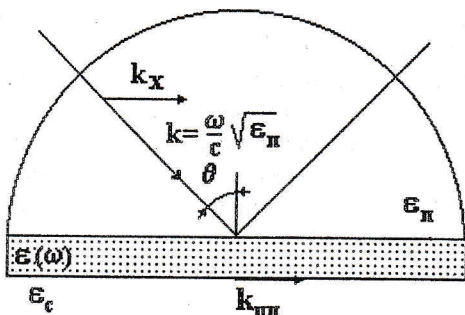


Рис.1. Схема збудження поверхневого плазмону за допомогою призми в геометрії Кретчмана (Кретчман-конфігурація).

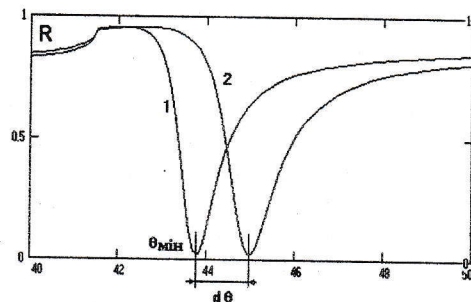


Рис.2. Відбиття плівки золота (1) і тієї ж плівки після нанесення на неї шару діелектрика (2) в геометрії ППВО Кретчмана.



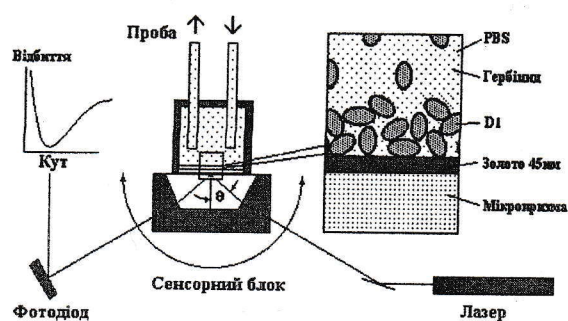


Рис.3. Схема ППР-пристрою та модель шарової структури.

біомолекулами з малою та великою молекулярними масами. ППР-моніторинг таких взаємодій в реальному режимі часу дає можливість для спостереження кінетики зміни оптичної товщини біомолекулярного комплексу і, як результат, реєструвати присутність молекул малих розмірів.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Виділення білку D1 проводилось в відповідності з методом [5] з гороху (*Pisum sativum* L.).

#### ППР-виміри

Виміри проводились на комп'ютеризованому ППР-пристрої з Кретчман-конфігурацією сенсорного оптичного блоку (Рис.3). Використовувались гелій - неоновий лазер з потужністю 2 мВт з р-поляризацією випромінювання, скляна мікропризма ( $n=1.51$ ), проточна кювета (оргскло, кільце з силіконової гуми діаметром 8 мм і 1 мм висотою) та реєструючий фотодіод. Змінна мікропризма та реєструючий фотодіод розміщені на столику, що обертається ( $0.01^\circ$  роздільна здатність по куту). Мікропризма являє собою скомплектовану сенсорну структуру (скло, шар золота, шар тіолів), що дозволило проводити вимірювання з більш високою точністю в порівнянні з вимірами на змінних скляних пластинках, де необхідно використовувати імерсійну рідину для отримання оптичного контакту з призмою. Шар золота товщиною 45 нм був напилений (термічне напилення,  $10^{-3}$  Па) на поверхню мікропризми з одночасним напиленням підшару хрому товщиною  $\approx 3$  нм для поліпшення адгезії. Під час вимірювань положення мінімуму ППР-кривої реєструвалось в вигляді сенсограми. Всі виміри проводились при кімнатній температурі.

#### Регстрація гербіцидів з використанням реакції заміщення пластохінону

Білок D1 був розчинений в фосфатному буферному розчині (PBS) ( $pH=7.4$ , 25 мМ  $KH_2PO_4$ , 25 мМ NaCl) і розбавлений до концентрації 5 мГ/мл. Проба розчину білку (100 мкл) вводилась в вимірювальну кювету на 30 хвилин. Після промивки кювети буферним розчином на протязі приблизно 30 хвилин реєструвався реальний дрейф підготовленої до основного етапу вимірювань системи. Після стабілізації в кювету вводилась проба розчину атразину визначеної концентрації і реєструвалась кінетика реакції заміщення пластохінону гербіцидом. Щоб визначитися, чи дійсно процес заміщення відбувся, аналогічний експеримент був проведений з білком D1, з якого попередньо за допомогою гексану був екстрагований пластохінон. І хоч білок зберігав при цьому здатність до зв'язування з гербіцидом, реакція заміщення в даному випадку не спостерігалась (Рис.4). По цій схемі був проведений ряд експериментів для визначення та оптимізації чутливості сенсора.

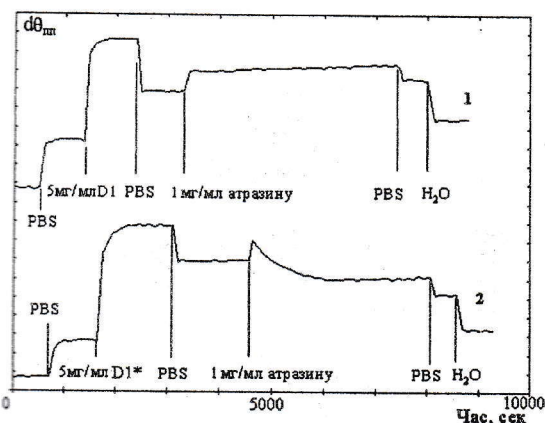


Рис.4. Сенсограми реакції зв'язування атразину з очищеним від пластохінону білком D1(1) та заміщення пластохінону в неочищеному білку D1\*(2).

мінімуму зменшуються. З другого боку, в зв'язку з проблемою реєстрації молекул малих розмірів виникає питання, пов'язане з селективністю вимірів і необхідністю очищення розчинів. Дані експериментів підтверджують, що пряма реєстрація малих концентрацій біомолекул з молекулярною масою менше 500 дальтон, зважаючи на присутність дрейфових явищ, є проблематичною.

Іншим шляхом для забезпечення такої реєстрації є методики, в яких використовуються різні форми специфічних взаємодій між

біомолекулами з малою та великою молекулярними масами. ППР-моніторинг таких взаємодій в реальному режимі часу дає можливість для спостереження кінетики зміни оптичної товщини біомолекулярного комплексу і, як результат, реєструвати присутність молекул малих розмірів.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Виділення білку D1 проводилось в відповідності з методом [5] з гороху (*Pisum sativum* L.).

#### ППР-виміри

Виміри проводились на комп'ютеризованому ППР-пристрої з Кретчман-конфігурацією сенсорного оптичного блоку (Рис.3). Використовувались гелій - неоновий лазер з потужністю 2 мВт з р-поляризацією випромінювання, скляна мікропризма ( $n=1.51$ ), проточна кювета (оргскло, кільце з силіконової гуми діаметром 8 мм і 1 мм висотою) та реєструючий фотодіод. Змінна мікропризма та реєструючий фотодіод розміщені на столику, що обертається ( $0.01^\circ$  роздільна здатність по куту). Мікропризма являє собою скомплектовану сенсорну структуру (скло, шар золота, шар тіолів), що дозволило проводити вимірювання з більш високою точністю в порівнянні з вимірами на змінних скляних пластинках, де необхідно використовувати імерсійну рідину для отримання оптичного контакту з призмою. Шар золота товщиною 45 нм був напилений (термічне напилення,  $10^{-3}$  Па) на поверхню мікропризми з одночасним напиленням підшару хрому товщиною  $\approx 3$  нм для поліпшення адгезії. Під час вимірювань положення мінімуму ППР-кривої реєструвалось в вигляді сенсограми. Всі виміри проводились при кімнатній температурі.

#### Регстрація гербіцидів з використанням реакції заміщення пластохінону

Білок D1 був розчинений в фосфатному буферному розчині (PBS) ( $pH=7.4$ , 25 мМ  $KH_2PO_4$ , 25 мМ NaCl) і розбавлений до концентрації 5 мГ/мл. Проба розчину білку (100 мкл) вводилась в вимірювальну кювету на 30 хвилин. Після промивки кювети буферним розчином на протязі приблизно 30 хвилин реєструвався реальний дрейф підготовленої до основного етапу вимірювань системи. Після стабілізації в кювету вводилась проба розчину атразину визначеної концентрації і реєструвалась кінетика реакції заміщення пластохінону гербіцидом. Щоб визначитися, чи дійсно процес заміщення відбувся, аналогічний експеримент був проведений з білком D1, з якого попередньо за допомогою гексану був екстрагований пластохінон. І хоч білок зберігав при цьому здатність до зв'язування з гербіцидом, реакція заміщення в даному випадку не спостерігалась (Рис.4). По цій схемі був проведений ряд експериментів для визначення та оптимізації чутливості сенсора.

#### Регстрація гербіцидів з використанням "конкурентного" методу

Хлоропластовий білок D1 був очищений від пластохінону за допомогою гексану. Екстрагований таким чином білок був розчинений в 25 мМ буферному розчині (25 мМ NaCl,  $pH$  7.4) і розбавлений до концентрації 5 мГ/мл. Далі на поверхню золота сорбувався цистеїн (з розчину 1 мГ/мл на протязі 2-х годин). Як відомо, місце зв'язування залягає глибоко всередині білку D1 на відстані від поверхні молекули, що дорівнює 10 атомам вуглецю[6]. З метою зменшити просторові обмеження та підвищити ефективність взаємодії, метрибузин був закріплений на поверхні металу не безпосередньо, а з використанням проміжної



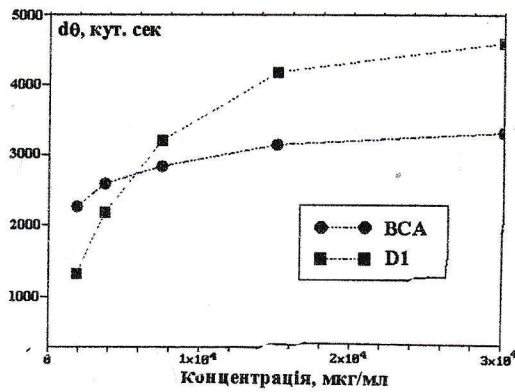


Рис.5. Зміщення кута плазмонного резонансу при адсорбції на поверхню золота BSA і D1 з розчинів різних концентрацій.

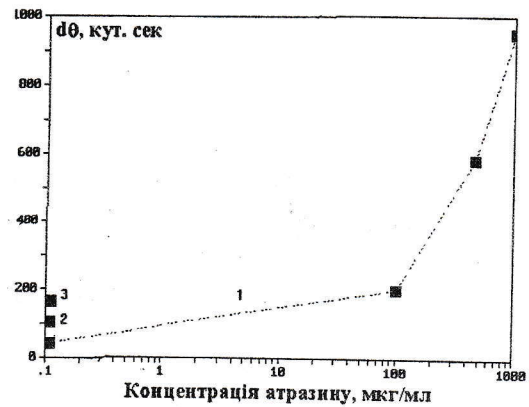


Рис.6. Зміщення кута плазмонного резонансу в залежності від концентрації атразину. 1-реакція заміщення в буферному розчині з рН=7.4, 2- рН=5.2, 3- рН=2.2.

молекули гексаметилендіаміду, яка є зв'язуючим ланцюжком. Спочатку мікропризма з шаром золота, покритого цистеїном, на протязі 2-х годин оброблялась в 0.1% розчині глутаральдегіду, після цього відмивалась в буферному розчині і занурювалась в 1% розчин гексиметилендіаміду на 2 години. Потім мікропризма знову відмивалась в буферному розчині і занурювалась в розчин метрибузину концентрацією 1мг/мл на 2 години. Після цього проба, що містить суміш екстрагованого білку D1 концентрацією 1мг/мл з метрибузином в різних концентраціях вводилась в кювету і проводився запис сенсограми.

## РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

### Реакція заміщення

Внаслідок гранично малих для методу ППР значень молекулярної маси атразину реакція специфічного зв'язування між екстрагованим білком D1 і гербіцидом, як і очікувалось, практично не спостерігалася (рис 4.1.), тому в подальшому ми будемо обговорювати тільки реакцію заміщення. На цьому же малюнку наведена сенсограма (рис. 4.2), що показує кінетику реакції заміщення між атразином та неекстрагованим білком D1, де явно помітний відклик на введення проби з гербіцидом. Наведені сенсограми показують кінетику реакцій для шару білку, що утворився при сорбції з розчину D1 концентрацією 5 мг/мл, яка була визначена після ряду експериментів. При даній концентрації товщина сорбційного шару, що утворювався, була оцінена нами в 8.5-9.5 нм [7](виходячи з коефіцієнту заломлення білку  $N_{\text{ef}}=1.36$ ), що значно перевищує товщину моношару. Справді, порівняльні експерименти, проведені для двох типів білків-гідрофобного рослинного D1 та амфіфільного волового сироваткового альбуміну (BSA) демонструють значну відмінність в товщині сорбційного покриття, отриманого з розчинів високої концентрації (до 30 мг/мл) (рис. 5). Враховуючи співвідношення молекулярних мас двох білків- 69 кДа для BSA і 39 кДа для D1, а також відомий факт відсутності для BSA сорбції на моношар [8], можна стверджувати, що для рослинного білку відзначається неупорядкована полімолекулярна сорбція, яка приводить до утворення на поверхні золота пористої структури товщиною в декілька моношарів. Це підтверджують дані, отримані за допомогою силового атомного мікроскопу (САМ) (Рис.7-8). Спроможність утворювати при сорбції мультишари є принциповою особливістю рослинного білку D1 і пояснюється, на наш погляд, високою гідрофобністю

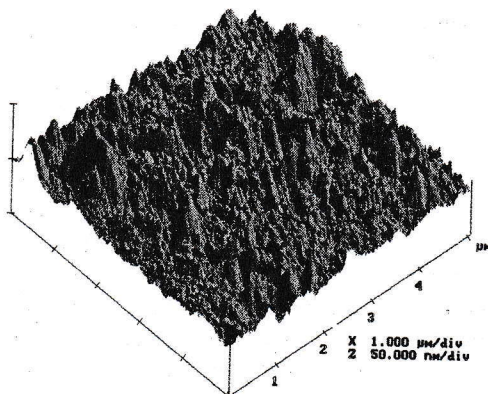


Рис.7. САМ зображення сорбованого на поверхні золота білку D1. Сорбція з розчину 10 мг/мл.

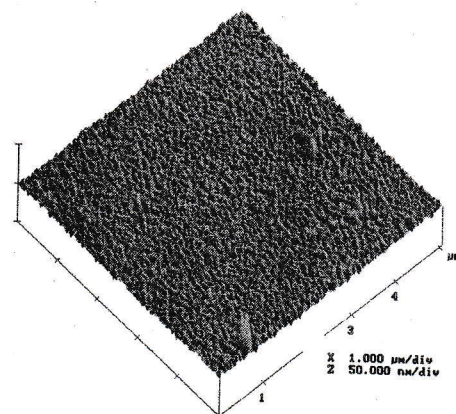


Рис.8. САМ зображення сорбованого на поверхні золота BSA. Сорбція з розчину 10 мг/мл.



## Реєстрація біомолекул малих розмірів методом поверхневого плазмонного резонансу

його зовнішніх структур (експерименти показали значно ослаблену сорбцію D1 на гідрофільне золото). Ця особливість дозволяє отримувати пористі шари типу псевдоматриксів, котрі розширюють зону взаємодії між реагентами. Наші результати по формуванню шару білку показують пряму залежність чутливості сенсора від параметрів сорбції (концентрації білку, рН та іонної сили розчину). Тільки умови, сприятливі до формування шару білку з високою пористістю дозволяють отримати достатньо високу чутливість. На рис. 6 наведена залежність ППР-відгуку сенсора від концентрації атразину у фосфатному буферному розчині рН=7.4 молярністю 25 мМ/мл. В діапазоні концентрацій атразину  $10^2 - 10^3$  мГ/мл зміщення положення мінімуму ППР-кривої досягало 200-1000 кутових секунд, яке зменшувалось до 40 кутових секунд при концентрації атразину 100 нГ/мл. Чутливість підвищується при сорбції білку на поверхню з буферного розчину з значеннями рН=5.2-2.2 (при цьому зміщення положення мінімуму ППР-сигналу збільшується до 110-170 кутових секунд для концентрації атразину 100 нГ/мл). Можна припустити, що часткова денатурація молекул білку поліпшує доступ молекул атразину до місць зв'язування в результаті конформаційних змін в молекулах білку.

### Конкурентний метод

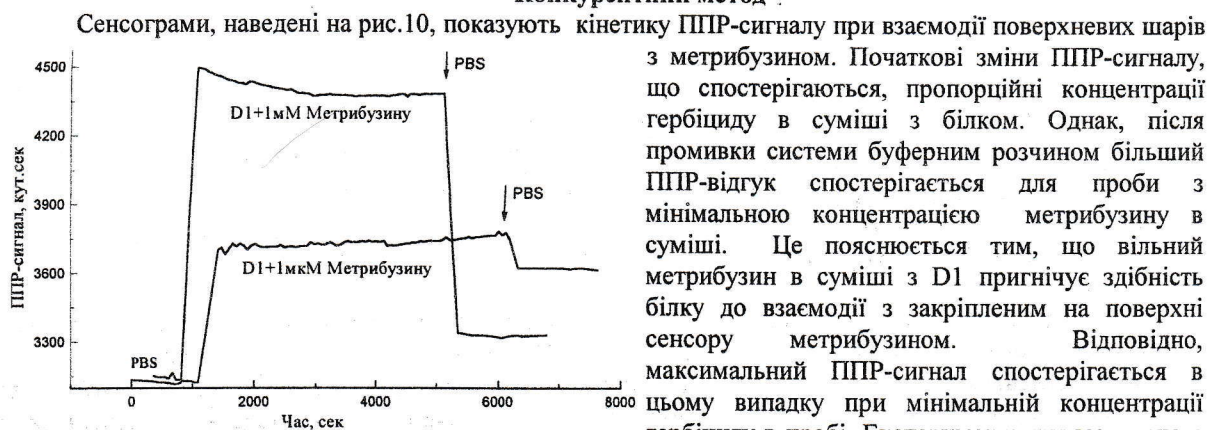


Рис. 10. Сенсограми, що отримані при "конкурентному" методі реєстрації молекул з малою молекулярною масою.

0.1 мкГ/мл, але програє йому в зручності та необхідності попередньої підготовки поверхні сенсора.

### ВИСНОВКИ

Отримані результати показують широкі можливості методу ППР в дослідженні міжмолекулярних взаємодій між біомолекулами, розмір яких варіюється від 200 до 32000 Дальтон. Межа реєстрації для молекул малого розміру визначена в 100 мкГ/мл для прямих вимірів та 0.1 мкГ/мл для конкурентного методу. Використання нових технологій з попередньою концентрацією гербіцидів дозволяє підвищити чутливість в 1000 разів і робить можливим використання ППР-методу для реєстрації гербіцидів в питній воді. Приведена технологія може бути використана для реєстрації біологічних реакцій за участю молекул малих розмірів як в фундаментальних так і в прикладних дослідженнях в медицині, екології та біотехнології.

Фінансова підтримка роботи частково забезпечувалась за рахунок гранту INTAS UA 95-0161

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. S. Lofas et al. Bioanalysis with surface plasmon resonance. (1991). *Sens. & Act. B*, B5, 113-121.
2. E. P. Fuerst, Interactions of Herbicides with Photosynthetic Electron Transport. (1991). *Weed Science*, 39, 458-464.
3. Н.Л.Дмитрук, В.Г.Литовченко, В.Л.Стрижевский. Поверхностные поляритоны в полупроводниках и диэлектриках. Киев, Наукова думка, 1989.
4. E. Kretschmann, Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmawingungen. (1971). *Phys.*, 241, 313-314.
5. E. V. Piletskaya, S. A. Piletsky, N. F. Lavrik. The estimation of the photosynthesis-inhibiting herbicides concentration with thylakoid membranes and their compounds. (1997). *Biochemistry and physiology of cultivated plants*, 29, 234-240.
6. R. Jockers, F. F. Bier and R. D. Schmid Specific binding of photosynthetic reaction centers to herbicide -modified grating couplers. (1993). *Analytica Chimica Acta* 280, 53-59.
7. Shirshov Yu.M., Chegel V.I., Subbota Yu.V., Matsas E.P., Kostioukevich E.V, Rachcov A.E. R.Merker. Biosensors, based on SPR and optimization of their working parameters. SPIE Proceeding of 5th Int. Workshop on Electronic Properties of Metal/Nonmetal Microsystems (EPMS'95), Poland, Polanica Zdroj, 11-14 Sept., 1995, vol. 2780, pp.257-260.
8. M. Malmsten. Ellipsometry studies of protein layers adsorbed at hydrophobic surfaces. (1994). *J. Coll. Int. Sci.*, 166, 333-342.