

PACS numbers: 62.23.Pq, 78.30.-j, 78.67.Bf, 81.07.Wx, 87.14.E-, 87.15.K-, 87.64.Ee

## Адсорбция белков на частицах наноразмерного порошка $\text{CoFe}_2\text{O}_4$

А. Г. Першина, А. Э. Сазонов, В. И. Итин\*, О. Г. Терехова\*, А. А. Магаева\*

*Сибирский государственный медицинский университет,  
просп. Московский, 2,  
634050 Томск, Россия*

*\*Отдел структурной макрокинетики ТНЦ СО РАН,  
просп. Академический, 10/4,  
634021 Томск, Россия*

Установлена адсорбционная активность наноразмерных частиц  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , синтезированных методом механохимического синтеза из солевых систем, в отношении белковых молекул на примере бычьего сывороточного альбумина (БСА) и фермента *Taq*-полимеразы. Размер, структура и состав частиц охарактеризованы методом электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа. Молекулы белков иммобилизуются на поверхности частиц, стабилизированных Tween в водных буферных системах. Связывание подтверждено методом ИК-спектроскопии. Получен функциональный бионаноккомпозит на основе суперпарамагнитных частиц нанопорошка  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ .

Встановлено адсорбційну активність нанорозмірних частинок  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , синтезованих методою механохімічної синтези із солевих систем, щодо білкових молекул на прикладі бичачого сироваткового альбуміну (БСА) і ферменту *Taq*-полімерази. Розмір, структуру й склад частинок охарактеризовано методою електронної мікроскопії та рентгеноструктурної аналізи. Показано, що молекули білків іммобілізуються на поверхні частинок, стабілізованих Tween у водних буферних системах. Зв'язування підтверджено методою ІЧ-спектроскопії. Одержано функціональний біонаноккомпозит на основі суперпарамагнетних частинок нанопорошку  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ .

Adsorption activity of nanosize  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  particles with regard to albumin molecules is demonstrated for bovine serum albumin (BSA) and enzyme *Taq*-polymerase. These nanoparticles are prepared using mechanochemical synthesis. Sizes, structure and composition of the particles are characterized using transmission electron microscopy and x-ray diffraction. The binding of nanoparticles and proteins is confirmed by IR-spectrometry. Functional bionanocomposite based on the superparamagnetic particles of  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  nanopowder is fabricated.

**Ключевые слова:** наноразмерные частицы, БСА, Taq-полимераза, адсорбция,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ .

*(Получено 21 ноября 2007 г.)*

## 1. ВВЕДЕНИЕ

Результаты исследований в области нанотехнологии, интегрирующей передовые достижения физики, химии и биологии, находят широкое применение для решения актуальных задач биотехнологии и медицины. Интерес к использованию наноматериалов обусловлен тем, что при переходе к наноразмерам фундаментальные характеристики вещества меняются, в результате чего в твердом теле проявляются новые физические явления и свойства [1]. Малые размеры частиц (менее 100 нм) сопоставимы с размером белка (5–50 нм) и высокоразвитая поверхность позволяет наночастицам активно взаимодействовать с биомолекулами на индивидуальном уровне. Значительный интерес представляют наночастицы, обладающие магнитными свойствами, что обусловлено возможностью управления конструкциями на их основе в магнитном поле. Магнитные наночастицы широко используются для иммобилизации сигнальных молекул белковой природы, пептидов и ферментов. На основе композитов наночастиц с антителами или их фрагментами разрабатывают методы высокочувствительной диагностики и высокоспецифичные магнитоуправляемые транспортные системы целевой доставки терапевтических молекул (олигонуклеотидов, лекарственных препаратов и др.) [2]. Использование магнитных наночастиц для иммобилизации ферментов, приводит к стабилизации последних: продлению срока их хранения, повышению устойчивости к неблагоприятным воздействиям pH, температуры, и, кроме того, препятствует протеолитической деградации [3]. Использование магнитной сепарации позволяет отделять иммобилизованный фермент с целью повторного использования.

Адсорбция молекулы белка на поверхности наноносителя может обеспечиваться за счет неспецифических ван-дер-ваальсовых, гидрофобных, электростатических взаимодействий, водородных связей, либо в результате образования ковалентной связи [4]. Относительный вклад каждого типа связи зависит от химических характеристик поверхности частицы и функциональных групп на поверхности белковой молекулы. Основными механизмами адсорбции белков на наноматериалах являются электростатические, гидрофобные взаимодействие и специфическая химическая связь [5].

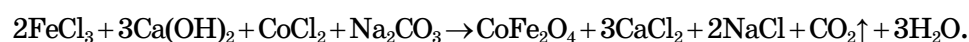
Наночастицы, обладающие высокой поверхностной активностью, характеризуются склонностью к агрегации. В этой связи, для их биомедицинского использования необходимо создавать устойчивую коллоидную систему наночастиц в водных средах. Одним из при-

влекательных подходов к стабилизации наночастиц является покрытие их полимерами. Наиболее часто для этих целей используют полиэтиленоксид, полиэтиленгликоль, декстран, крахмал. Дополнительные преимущества полимерного покрытия обусловлены тем, что полимеры могут играть роль «спейсера» для связывания белковых молекул с наночастицей и обеспечивать биосовместимость [6].

Целью данной работы является исследование возможности создания бионаноконструкта на основе частиц наноразмерного порошка феррита кобальта и белков. Для достижения этой цели проводили адсорбцию бычьего сывороточного альбумина (БСА) и фермента синтеза нуклеиновых кислот Таq-полимеразы на поверхности стабилизированных в водной среде частиц  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ .

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наноразмерный порошок кобальтового феррита  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  получен методом механохимического синтеза из солевых систем в присутствии инертного разбавителя  $\text{NaCl}$  [7]. Для синтеза кобальтовой феррошпинели использовали реакцию:



Параметры кристаллической структуры, фазовый состав и дисперсность синтезированного наноферритмагнитного порошка исследовали методами просвечивающей электронной микроскопии (ЭМ-125) и рентгеноструктурного анализа (дифрактометр Shimadzu XRD 6000,  $\text{CuK}_\alpha$ -излучение). Магнитные свойства гексагонального ферритмагнетика изучали в импульсных магнитных полях напряжённостью 3 Т с помощью автоматизированного магнитометра [8]. Удельную поверхность порошка кобальтового феррита измеряли методом БЭТ на приборе серии СОРБИ® N.4.1.; в качестве газа-адсорбата использовали азот. Стабильный коллоидный раствор наночастиц (1 мг/мл) получали методом ультразвукового диспергирования частиц нанопорошка в буфере содержащем 20 mM Tris, 50 mM KCl, 0,1% Tween-20 (Microson XL2005, Farmingdale). Предельный размер частиц в суспензии определяли на лазерном анализаторе (Microtrac S3000, Horiba, Япония). Измерения дзета-потенциала наночастиц в буфере 20 mM Tris, 50 mM KCl, 0,1% Tween-20 (при pH от 4,0 до 10,0), проводили на приборе Чайковского методом передвигающейся границы.

В работе использовали: лиофилизированный бычий сывороточный альбумин (БСА) фракция V (Sigma, США) и рекомбинантную Таq-полимеразу, любезно предоставленную лабораторией фармакогеномики Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, Россия).

Иммобилизацию проводили смешиванием стабилизированной суспензии частиц  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  с раствором БСА (0,5 мг/мл 20 mM Tris, 50 mM KCl (pH = 6,4) раствора фермента (50 е.а./мкл, pH = 8,5) в объемном соотношении 10:1. Смесь инкубировали в течение 16 часов на роторном шейкере при rpm 40 (Biosan Multi RS60, Латвия) при температуре 25°C. Преципитаты частиц и белка отделяли из раствора методом магнитной сепарации с использованием постоянного магнита с поверхностной намагниченностью 2000 G и промывали 20 mM Tris-HCl (pH = 8,0). Концентрацию белка измеряли методом Бредфорд при OD<sub>595</sub> на спектрофотометре (СФ 2000, Россия) [9]. Количество не связанного белка в супернатанте определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием БСА; количество иммобилизованного белка рассчитывали по формуле:  $A = (C_o - C_i)V/m$ , где  $A$  — количество связанного белка;  $C_o$  — исходная концентрация раствора белка;  $C_i$  — концентрация несвязанного белка в супернатанте;  $V$  — объем реакционной среды;  $m$  — масса нанопорошка.

ИК-спектры снимали на ИК-фурье-спектрометре (Nicolet 5700, США) на приставке диффузного отражения в KBr в диапазоне 4000–400 см<sup>-1</sup>.

Функциональную активность иммобилизованной на частицах  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  Taq-полимеразы определяли методом ПЦР в режиме реального времени на совмещенном амплификаторе-флуориметре АМФ001 (Биомедсиб, Россия). Для постановки ПЦР использовали олигонуклеотидные праймеры на ген глицероальдегидфосфатдегидрогеназы (GAPDH) (Синтол, Москва). Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала: 60 mM Tris-HCl (pH 8.9), 25 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% Triton X100, 200 мкМ dNTP, 200 пкМ каждого специфического олигонуклеотидного праймера, SYBR Green I (1:5000 от коммерческого стокового раствора, 'Molecular Probes', США), 20 нг/мкл ДНК лейкоцитов человека, 1 мкл Taq-полимеразы (5 е.а./мкл).

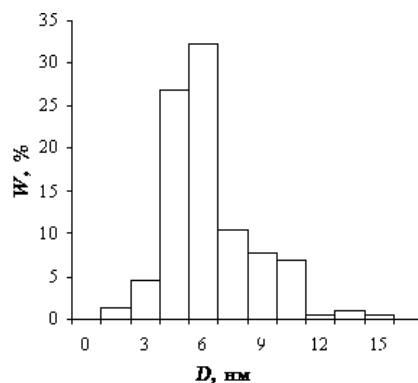
Статистическую обработку данных проводили, используя пакет программ Statistic 6.0. for Windows.

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Характеристика частиц нанопорошка $\text{CoFe}_2\text{O}_4$

Исследования кобальтового феррита методом просвечивающей электронной микроскопии показало, что синтезированный порошок представляет собой наноразмерные сферические частицы со средним диаметром в интервале 6–12 нм (рис. 1). Микроэлектронограмма порошков имела характерное кольцевое строение с выраженным диффузным максимумом в области малых углов рассеяния.

По данным рентгеноструктурного анализа определен параметр решетки (0,8376 нм), средний размер частиц (11 нм). Содержание



**Рис. 1.** Гистограмма распределения размеров частиц порошка кобальтового феррита  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ .

шпинельной фазы в порошке  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  составляет 98,8% масс., примеси гематита ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) — 1,2% масс. Площадь удельной поверхности частиц кобальтовой шпинели равна  $113 \text{ м}^2/\text{г}$ . Рассчитанный из этого значения диаметр сферических частиц — 10 нм, что хорошо согласуется с данными электронно-микроскопического и рентгеноструктурного анализов.

Величина удельной намагниченности составляла  $22 \text{ Гс}\cdot\text{см}^3/\text{г}$ . Наноразмерный порошок находится в суперпарамагнитном состоянии.

### 3.2. Стабилизация частиц нанопорошка $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ в водных системах

С целью проведения иммобилизации белков в водных средах получали устойчивые суспензии частиц порошка  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , в диапазоне pH буферного раствора от 4.0 до 10.0. В качестве стабилизатора использовали Tween20 в концентрации 0,1%. По данным исследований проведенных на лазерном анализаторе, было показано, что размер частиц в суспензии не превышал 20 нм.

Стабилизация суспензии нанопорошка могла достигаться за счет покрытия частиц полимером. Это предположение хорошо согласуется с данными ИК-спектроскопии (рис. 2). Так, на ИК-спектрах нанопорошка  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , стабилизированных Tween-20, выявляются полосы поглощения в диапазоне  $600\text{--}400 \text{ см}^{-1}$  характерные для шпинелей, а так же присутствуют характерные полосы поглощения полимера при  $1742,8 \text{ см}^{-1}$ , при  $2855,9 \text{ см}^{-1}$ , обусловленная жирнокислотным остатком Tween-20, и при  $1066,5 \text{ см}^{-1}$ , принадлежащая колебаниям C–O связи. На спектре чистого кобальтового феррита детектируется полоса поглощения, при  $875 \text{ см}^{-1}$  характерная для (–OH) группы [10]. Появление гидроксильной группы на поверхности наноразмерного  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , обусловлено особенностями их синтеза, в котором вода явля-

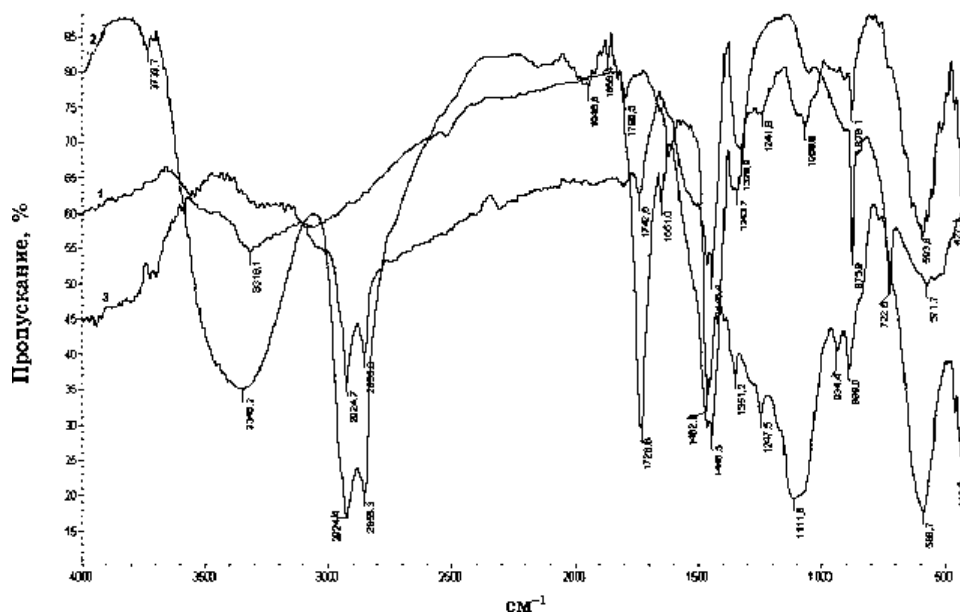


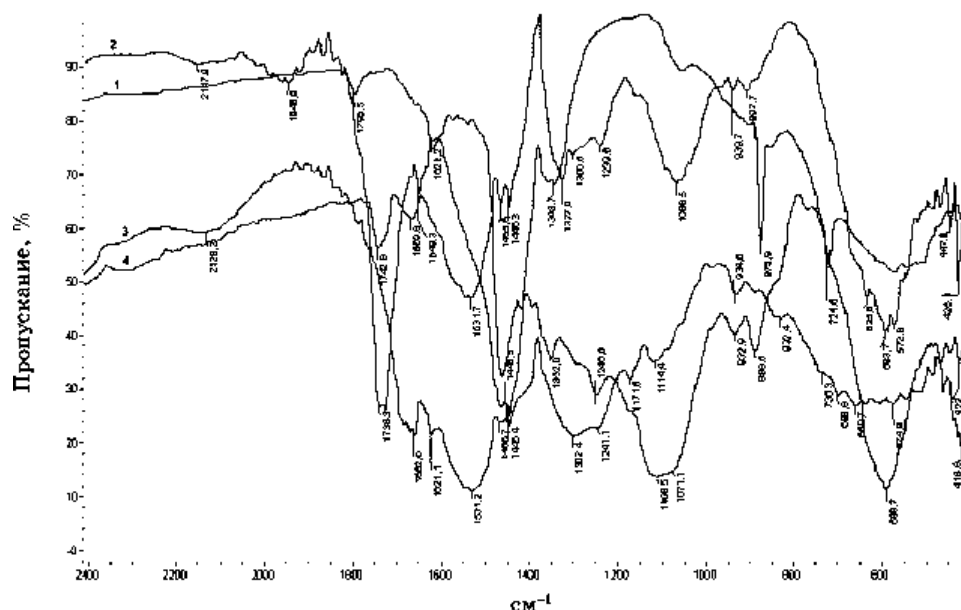
Рис. 2. ИК-спектры: (1) частицы нанопорошка кобальтового феррита  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , (2) Tween-20, (3) частицы нанопорошка кобальтового феррита  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , стабилизированные Tween-20.

ется участником реакции. Таким образом, взаимодействие Tween-20 с частицами нанопорошка препятствует их агрегации.

Измерение дзета-потенциала на поверхности наноразмерных частиц феррита кобальта в стабилизирующем буфере показало, что они имели положительный заряд, а величина электрокинетического потенциала зависит от pH.

### 3.3. Иммунизация белков на частицах нанопорошка $\text{CoFe}_2\text{O}_4$

Иммунизацию БСА проводили согласно методике при значениях pH стабилизирующего буфера (20 mM Tris, 50 mM KCl, 0,1% Tween-20) от 4.0 до 10.0 с шагом 1. На основании данных спектрофотометрического определения несвязавшегося белка в супернатанте были проведены расчеты количеств белка, связываемого частицами нанопорошка. В результате сравнения количеств связываемого белка при разных pH достоверных отличий в эффективности адсорбции БСА на наноразмерном феррите кобальта не обнаружено (при  $p > 0,05$ ). Таким образом показано, что эффективность адсорбции не зависит от pH раствора. Адсорбционная емкость частиц нанопорошка феррита кобальта относительно БСА, составила 1:3 (в пересчете на сухой вес), так 1 мг частиц  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  связывает  $0,32 \pm 0,06$  мг белка.



**Рис. 3.** ИК-спектры: (1) частицы нанопорошка кобальтового феррита  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , (2) Tween-20 (3) Бычий сывороточный альбумин (4) Бычий сывороточный альбумин, иммобилизованный на частицах нанопорошка кобальтового феррита  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , стабилизированных Tween-20.

Связь БСА с магнитными частицами качественно исследована методом ИК-спектроскопии (рис. 3). На ИК-спектре преципитата БСА- $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  показано присутствие полос поглощения белка при  $1669,8 \text{ см}^{-1}$  и  $1531,7 \text{ см}^{-1}$ , обусловленных ( $-\text{NH}-$ ) группами; при  $1446,3 \text{ см}^{-1}$  и  $1327,0 \text{ см}^{-1}$ , характерных для ( $-\text{CO}-$ ) групп, что подтверждает факт иммобилизации БСА на поверхности наноразмерных частиц [10, 11]. Важно отметить исчезновение полосы поглощения, присутствующей на спектре чистого кобальтового феррита, при  $875 \text{ см}^{-1}$ , принадлежащей ( $-\text{OH}$ ) группе. Это позволяет высказать предположение об участии гидроксильной группы в образовании химической связи с белком [12]. Взаимодействие Tween-20 и белка при адсорбции могут носить с одной стороны конкурентный характер — неионогенные ПАВ способны вытеснить белок с межфазной поверхности, однако они могут участвовать в образовании комплекса с белком и способствовать его адсорбции [13]. Так полоса поглощения при  $1327,0 \text{ см}^{-1}$  предположительно указывает на адсорбцию БСА на поверхности частиц  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  за счет кооперации с Tween-20. Взаимодействие белка с полимерным покрытием наночастиц может осуществляться за счет гидрофобных и гидрофильных взаимодействий, которые обусловлены присутствием полярных и неполярных группировок как в структуре Tween-20, так и в моле-

куле белка [14]. В механизме адсорбции белка на  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  дополнительная прочность связывания может достигаться за счет образования комплекса белка с ионом металла [15].

Значительную роль при иммобилизации белка на поверхности наночастиц могут играть электростатические взаимодействия [5]. Действительно, БСА — кислый белок ( $\text{PI}_{\text{БСА}} = 4,78$ ), что способствует электростатическому взаимодействию его с положительно заряженной поверхностью частиц феррита кобальта. Учитывая, что при значениях pH ниже изоэлектрической точки молекула белка становится положительно заряженной, так же как и поверхность частицы кобальтового феррита, силы электростатического отталкивания при одноименном заряде белка и носителя должны препятствовать адсорбции белка в данных условиях. Согласно нашим данным, эффективность адсорбции при  $\text{pH} = 4,0$  не отличалась от данного показателя вычисленного при  $\text{pH} \geq 5,0$ . Это указывает на то, что электростатические взаимодействия в данном случае не являются ведущим механизмом адсорбции, тем не менее, они могут играть определенную роль в ориентации молекулы белка на носителе.

В целом механизм адсорбции белка носит сложный характер, и не может быть объяснен одним типом взаимодействия [16]. Например, Уооп с соавторами показали, что при низких значениях pH адсорбция осуществляется преимущественно за счет гидрофобных взаимодействий, в то время как при pH выше изоэлектрической точки, иммобилизация БСА на поверхности микрочастиц происходит в основном за счет электростатического связывания [17]. Таким образом, даже в случае образования ковалентной связи при адсорбции белка на поверхности частицы, вклад более слабых взаимодействий (гидрофобных/гидрофильных и электростатических) может быть значительным. Более того, при иммобилизации они во многом определяют ориентацию белковой молекулы и конформацию полипептидной цепи белка, что важно для сохранения ее функциональной активности.

При адсорбции взаимодействия белковой молекулы с поверхностью носителя могут сопровождаться нарушением пространственной структуры белка, важной для сохранения ее функции [4, 16]. Было проведено исследование функциональной активности адсорбированной Taq-полимеразы из раствора фермента на наноразмерных частицах  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , стабилизированных Tween-20 при оптимальном для хранения фермента значении  $\text{pH} = 8,55$ . Taq-полимераза — кислый ( $\text{PI}_{\text{Taq}} = 6,4$ ) глобулярный белок, имеющий субъединичное строение.

Данные, полученные при проведении ИК-спектроскопии преципитатов Taq-полимеразы и нанопорошка  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , подтверждают успешную иммобилизацию фермента на поверхности частиц наноразмерного кобальтового феррита (рис. 4) Так регистрируется характерная для молекулы фермента полоса поглощения при  $1513,7 \text{ см}^{-1}$  (18). Исчезновение полосы поглощения при  $878,1 \text{ см}^{-1}$ , принадлежащей гидроксильной группе на поверхности стабилизированного  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ,



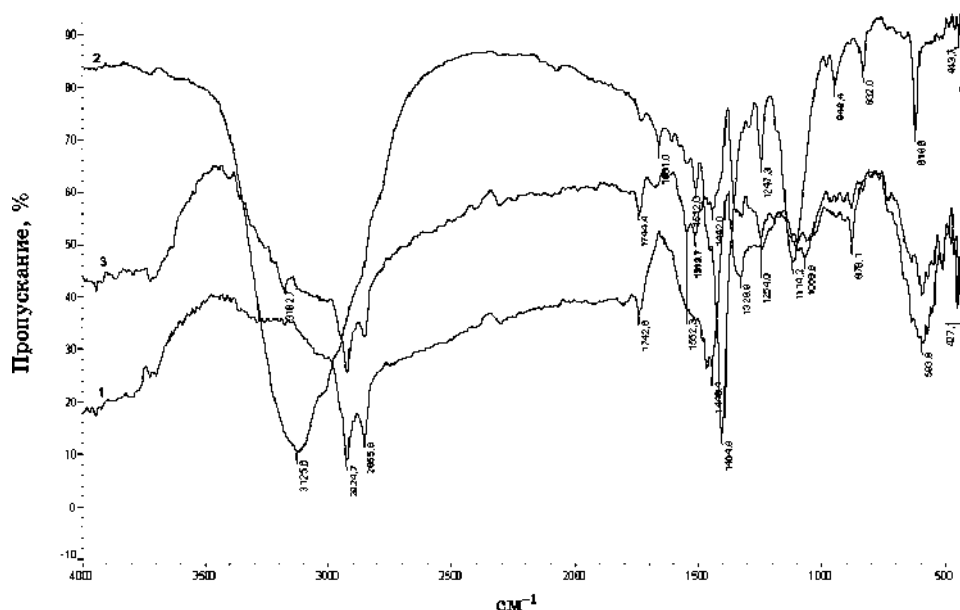


Рис. 4. ИК-спектры: (1) частицы нанопорошка кобальтового феррита  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , стабилизированные Tween-20, (2) фермент Taq-полимераза, (3) Taq-полимераза, иммобилизованная на частицах нанопорошка кобальтового феррита  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , стабилизированных Tween-20.

указывает на ее участие во взаимодействии с белком. Это хорошо согласуется с данными, полученными при ИК-спектроскопии иммобилизованного БСА, и позволяет нам предполагать участие тех же механизмов взаимодействия между молекулой фермента и стабилизированной частицей нанопорошка. Более слабо выраженные полосы поглощения фермента обусловлены малым количеством анализируемого белка, что связано со сложностями пробоподготовки.

Для исследования влияния иммобилизации на сохранение функциональной структуры молекулы фермента, была проверена его каталитическая активность. Иммобилизованную на частицах  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  Taq-полимеразу, после отделения из раствора методом магнитной сепарации, ресуспендировали в эквивалентном объеме буфера и использовали для постановки Real-time ПЦР. Наносвязанная Taq-полимераза успешно осуществляла синтез нуклеотидной цепи, что так же служит подтверждением факта иммобилизации, и сохранением функциональной активности фермента после адсорбции.

#### 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований физических свойств час-

тиц нанопорошка  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , показано, что данные частицы отвечают требованиям универсальных носителей биомолекул. Они обладают большой удельной поверхностью, малыми размерами, не ограничивающими диффузию в среде, стабильными магнитными характеристиками. Показана возможность получения стабильных суспензий в водных средах за счет модификации наноразмерных частиц  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  неионогенным ПАВ Tween-20. Важно отметить, что Tween-20 является нетоксичным и биосовместимым веществом и широко используется в молекулярной биологии, биохимии и фармакологии. Композиционный наноматериал  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ -Tween-20 обладает высокой сорбционной активностью относительно белков и может быть использован для создания функциональных бионаноконструктов. Которые в дальнейшем можно использовать для решения задач биотехнологии и медицины.

Работа поддержана грантами Администрации Томской области (договор № 469 от 12 декабря 2006 г.), РФФИ (06-04-96962-р\_офи) и РФФИ (07-04-12170-офи). Авторы выражают благодарность сотрудникам Научно-аналитического центра Томского политехнического университета за помощь в проведении ИК-спектроскопии.

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Ч. Пул, Ф. Оуэнс, *Нанотехнологии* (Москва: Техносфера: 2005).
2. Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, and J. Dobson, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, **36**: 167 (2003).
3. М.-Н. Liao and D.-Н. Chen, *Biotech. Lett.*, **23**: 1723 (2001).
4. И. В. Березин, Н. Л. Клячко А. Д. Левашов и др., *Иммобилизованные ферменты* (Москва: Высшая школа: 1987).
5. S. Patila, A. Sandberg, E. Heckert et al., *Biomater.*, **28**: 4600 (2007).
6. А.-Н. Lu, E. L. Salabas, and F. Schuth, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**: 1222 (2007).
7. P. G. MacCormick, J. Dind, W.-F. Miao et al., WO 97/07917, B22F 9/16 (1997).
8. В. Ю. Креслин, Е. П. Найден, *ПТЭ*, № 1: 63 (2002).
9. N. J. Kruger, *Methods Mol. Biol.*, **32**: 9 (1994).
10. А. Смит, *Прикладная ИК-спектроскопия* (Москва: Мир: 1982).
11. М. Koneracka, P. Korsansky, M. Antalik et al., *JMMM*, **201**: 427 (1999).
12. R. V. Mehta, R. V. Upadhyay, S. W. Charles, and C. N. Ramchand, *Biotechnology Techniques*, **11**: 493 (1997).
13. С. М. Ливачев, А. Е. Харлов, А. М. Кукушкина и др., *Вест. Моск. ун-та. Сер. 2: Химия*, **47**, № 3: 218 (2006).
14. T. M. Goppert and R. H. Muller, *J. of Drug Targeting*, **11**, No. 4: 225 (2003).
15. G. K. Kouassi, J. Irudayaraj, and G. McCarty, *J. of Nanobiotech.*, **3**: 1 (2005).
16. В. Н. Измайлова, Г. П. Ямпольская, Б. Д. Сумм, *Поверхностные явления в белковых системах* (Москва: Химия: 1988).
17. J. Y. Yoon, J. H. Lee, J. H. Kim, and W. S. Kim, *Colloids and Surfaces B: Bio-interfaces*, **10**: 365 (1998).
18. S.-H. Huang, M.-H. Liao, and D.-H. Chen, *Biotechnol. Prog.*, **19**: 1095 (2003).